

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-293130

(43)Date of publication of application : 04.11.1998

(51)Int.Cl.

G01N 33/68

C07K 1/00

G01N 31/00

(21)Application number : 09-091215

(71)Applicant : SEIKO INSTR INC

(22)Date of filing : 09.04.1997

(72)Inventor : ATAKA TATSUAKI  
SAKUHARA TOSHIHIKO  
UCHIDA TOYOAKI  
TSUGITA AKIRA  
TAKAMOTO KEIJI

(30)Priority

Priority number : 08130381

Priority date : 24.05.1996

Priority country : JP

09 35312

19.02.1997

JP

09 36610

20.02.1997

JP

(54) METHOD FOR DETERMINING SEQUENCE OF AMINO ACID FROM CARBOXY END OF PROTEIN OR PEPTIDE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To determine the sequence of amino acid from C end of protein or peptide by liberating the amino acid from the carboxy end (C end) of protein or peptide and then separating and identifying an amino acid thus obtained or a derivative thereof.

SOLUTION: An acid anhydride is caused to act on protein or peptide in order to protect the amino end of the protein or peptide and oxazolone is produced at the residue of amino acid of C end. Acid and alcohol are then caused to act on the protein or peptide where the produced C end is oxazolone and the C end amino acid is liberated. Subsequently, the combination of a series of operations comprising respective steps and the operation for separating and identifying the produced amino acid is performed repeatedly. According to the method, C end of protein or peptide can be determined without requiring any enzyme.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 02.09.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3124507

[Date of registration] 27.10.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

# (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-293130

(43) 公開日 平成10年(1998)11月4日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

識別記号

F I

G01N 33/68

G01N 33/68

C07K 1/00

C07K 1/00

G01N 31/00

G01N 31/00

V

審査請求 有 請求項の数25 O L (全35頁)

(21) 出願番号 特願平9-91215  
(22) 出願日 平成9年(1997)4月9日  
(31) 優先権主張番号 特願平8-130381  
(32) 優先日 平8(1996)5月24日  
(33) 優先権主張国 日本(J P)  
(31) 優先権主張番号 特願平9-35312  
(32) 優先日 平9(1997)2月19日  
(33) 優先権主張国 日本(J P)  
(31) 優先権主張番号 特願平9-36610  
(32) 優先日 平9(1997)2月20日  
(33) 優先権主張国 日本(J P)

(71) 出願人 000002325  
セイコーインスツルメンツ株式会社  
千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目8番地  
(72) 発明者 安宅 龍明  
千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目8番地 セ  
イコー電子工業株式会社内  
(72) 発明者 作原 寿彦  
千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目8番地 セ  
イコー電子工業株式会社内  
(72) 発明者 内田 豊明  
千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目8番地 セ  
イコー電子工業株式会社内  
(74) 代理人 弁理士 林 敬之助

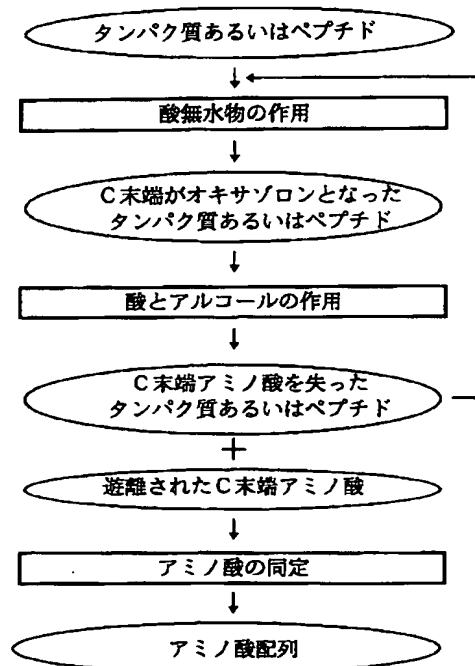
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法

(57) 【要約】

【課題】 酵素を用いることなく、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する。

【解決手段】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させカルボキシ末端をオキサゾロンとする工程を含むタンパク質またはペプチドのカルボキシ末端アミノ酸を遊離させる工程と、得られたアミノ酸またはアミノ酸誘導体を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返す方法を実施した。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 タンパク質またはペプチドのカルボキシ末端アミノ酸を遊離させる工程と、得られたアミノ酸またはアミノ酸誘導体を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返す方法において、タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、カルボキシ末端をオキサゾロンとする工程が含まれることを特徴とする、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 2】 タンパク質またはペプチドのカルボキシ末端アミノ酸を遊離させる工程と、得られたアミノ酸またはアミノ酸誘導体を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返す方法において、タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ末端を保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする工程が含まれることを特徴とする、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 3】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ末端を保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする第 1 工程と、生成したカルボキシ末端がオキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチドに酸とアルコールを作用させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる第 2 工程と、から構成される操作と、前記第 2 工程において得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 4】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ末端を保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする第 1 工程と、生成したカルボキシ末端がオキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチドに酸とアルコールを含む溶液を作用させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる第 2 工程と、から構成される操作と、前記第 2 工程において得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 5】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ末端を保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする第 1 工程と、生成したカルボキシ末端がオキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチドにエステルを作用させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる第 2 工程と、から構成される操作と、前記第 2 工程において得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 6】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ末端を保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする第 1 工程と、生成したカルボキシ末端が

オキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチドに酸とアルコールを含む溶液から得られるエステルを作用させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる第 2 工程と、から構成される操作と、前記第 2 工程において得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 7】 前記タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させアミノ末端を保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする第 1 工程において、酢酸を添加することを特徴とする請求項 3 から請求項 6 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 8】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ基を保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする第 1 工程と、アルコールを作用させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる第 2 工程と、アミンを作用させ、エステルを加水分解する第 3 工程と、から構成される一連の操作と、前記第 2 工程において得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 9】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ基を保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする第 1 工程と、アルコールを作用させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる第 2 工程と、アミンを作用させ、エステルを加水分解する第 3 工程と、から構成される一連の操作と、前記第 3 工程後にアミノ酸を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 10】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ基を保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする第 1 工程と、アルコールを作用させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる第 2 工程と、アミン水溶液を作用させ、エステルを加水分解する第 3 工程と、から構成される一連の操作と、前記第 2 工程において得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 11】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ基を保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする第 1 工程と、アルコールを作用させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる第 2 工程と、アミン水溶液を作用させ、エステルを加水分解する第 3 工程と、から構成される一連の操作と、前記第 3 工程後にアミノ酸を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順を

10

20

30

40

50

くり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 1 2】 前記タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させアミノ基保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする第 1 工程において、酢酸を添加することを特徴とする、請求項 8 から請求項 1 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 1 3】 前記アルコールを作用させカルボキシ末端アミノ酸を遊離させる第 2 工程を、酸存在下で実施することを特徴とする、請求項 8 から請求項 1 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 1 4】 前記タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させアミノ基保護しカルボキシ末端をオキサゾロンとする第 1 工程において酢酸を添加し、さらに前記アルコールを作用させカルボキシ末端アミノ酸を遊離させる第 2 工程を酸存在下で実施することを特徴とする、請求項 8 から請求項 1 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 1 5】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ基を保護しカルボキシ末端アミノ酸がアスパラギン酸ではない場合にはカルボキシ末端をオキサゾロンとし、カルボキシ末端アミノ酸がアスパラギン酸の場合にはカルボキシ末端を分子内酸無水物とする第 1 工程と、アルコールを作用させ、カルボキシ末端がオキサゾロンの場合にはカルボキシ末端アミノ酸を遊離させ、カルボキシ末端が分子内酸無水物の場合には分子内無水物をアルコリスにより開環させる第 2 工程と、酸無水物を作用させ、カルボキシ末端にオキサゾロンを生成させる第 3 工程と、アルコールで作用させ、カルボキシ末端アミノ酸をアミノ酸のエステルとして遊離させる、第 4 工程と、アミンを作用させ、エステルを加水分解する第 5 工程と、から構成される一連の操作と、前記第 2 工程において得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、前記第 5 工程において得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 1 6】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ基を保護しカルボキシ末端アミノ酸がアスパラギン酸ではない場合にはカルボキシ末端をオキサゾロンとし、カルボキシ末端アミノ酸がアスパラギン酸の場合にはカルボキシ末端を分子内酸無水物とする第 1 工程と、アルコールを作用させ、カルボキシ末端がオキサゾロンの場合にはカルボキシ末端アミノ酸を遊離させ、カルボキシ末端が分子内酸無水物の場合には分子内無水物をアルコリスにより開環させる第 2 工程

と、酸無水物を作用させ、カルボキシ末端にオキサゾロンを生成させる第 3 工程と、アルコールで作用させ、カルボキシ末端アミノ酸をアミノ酸のエステルとして遊離させる第 4 工程と、アミンを作用させ、エステルを加水分解する第 5 工程と、から構成される一連の操作と、前記第 2 工程において得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 1 7】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ基を保護しカルボキシ末端アミノ酸がアスパラギン酸ではない場合にはカルボキシ末端をオキサゾロンとし、カルボキシ末端アミノ酸がアスパラギン酸の場合にはカルボキシ末端を分子内酸無水物とする第 1 工程と、アルコールを作用させ、カルボキシ末端がオキサゾロンの場合にはカルボキシ末端アミノ酸を遊離させ、カルボキシ末端が分子内酸無水物の場合には分子内無水物をアルコリスにより開環させる第 2 工程と、酸無水物を作用させ、カルボキシ末端にオキサゾロンを生成させる第 3 工程と、アルコールで作用させ、カルボキシ末端アミノ酸をアミノ酸のエステルとして遊離させる第 4 工程と、アミンを作用させ、エステルを加水分解する第 5 工程と、から構成される一連の操作と、前記第 3 工程において得られたアミノ酸誘導体を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 1 8】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ基を保護しカルボキシ末端アミノ酸がアスパラギン酸ではない場合にはカルボキシ末端をオキサゾロンとし、カルボキシ末端アミノ酸がアスパラギン酸の場合にはカルボキシ末端を分子内酸無水物とする第 1 工程と、アルコールを作用させ、カルボキシ末端がオキサゾロンの場合にはカルボキシ末端アミノ酸を遊離させ、カルボキシ末端が分子内酸無水物の場合には分子内無水物をアルコリスにより開環させる第 2 工程と、酸無水物を作用させ、カルボキシ末端にオキサゾロンを生成させる第 3 工程と、アルコールで作用させ、カルボキシ末端アミノ酸をアミノ酸のエステルとして遊離させる第 4 工程と、アミンを作用させ、エステルを加水分解する第 5 工程と、から構成される一連の操作と、前記第 4 工程において得られた混合物からアミノ酸誘導体を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 1 9】 タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、アミノ基を保護しカルボキシ末端アミノ酸がアスパラギン酸ではない場合にはカルボキシ末端をオキサゾロンとし、カルボキシ末端アミノ酸がアスパラ

10

20

30

【請求項 24】 タンパク質あるいはペプチドにハロゲン化蟻酸のエステルを作用させ、アミノ基を保護しカルボキシ末端アミノ酸がアスパラギン酸ではない場合にはカルボキシ末端をオキサゾロンとし、カルボキシ末端アミノ酸がアスパラギン酸の場合にはカルボキシ末端を分子内酸無水物とする第 1 工程と、アルコールを作用させ、カルボキシ末端がオキサゾロンの場合にはカルボキシ末端アミノ酸を遊離させ、カルボキシ末端が分子内酸

無水物の場合には分子内無水物をアルコリスにより開環させる第 2 工程と、ハロゲン化蟻酸のエステルを作用させ、カルボキシ末端にオキサゾロンを生成させる第 3 工程と、アルコールで作用させ、カルボキシ末端アミノ酸をアミノ酸のエステルとして遊離させる第 4 工程と、アミンを作用させ、エステルを加水分解する第 5 工程と、から構成される一連の操作と、前記第 5 工程において得られた混合物からアミノ酸誘導体を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順をくり返し実施することを特徴とするタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 2 5】 前記アルコールを作用させ、カルボキシ末端がオキサゾロンの場合にはカルボキシ末端アミノ酸を遊離させ、カルボキシ末端が分子内酸無水物の場合には分子内無水物をアルコリスにより開環させる第 2 工程と、前記アルコールで作用させ、カルボキシ末端アミノ酸をアミノ酸のエステルとして遊離させる第 4 工程と、を酸存在下で実施することを特徴とする請求項 1 5 から請求項 2 4 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】 本発明は、タンパク質あるいはペプチドの構造解析法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】 従来、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端（C 末端）からのアミノ酸配列を決定するためには、図 3 に示すようにタンパク質あるいはペプチドにカルボキシペプチダーゼを反応させ、反応液を経時的に 1 部ずつ採取し、その反応液をアミノ酸分析装置で分析して遊離されたアミノ酸を定量する方法が用いられてきた（日本生化学会編、生化学実験講座第 1 巻、タンパク質の化学 II、203-211 ページ、1976 年発行）。また、その反応液を質量分析装置にかけて C 末端側のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドの質量を測定する方法も報告されている（A. Tsugita, R. van den Broek, M. Pyzybylski, FEBS. Lett. 137, 19(1982)）。さらに、化学的な方法の 1 例として、図 4 に示すように C 末端を無水酢酸で活性化し、トリメチルシリルイソチオシアネートを結合させ、塩酸で切断するという一連の操作を繰り返すことを利用した配列分析法も報告されている（D. H. Hawke, H-. W. Lahm, J. E. Shively, C. W. Todd, Anal. Biochem. 166, 298(1987)）。

【0 0 0 3】

【発明が解決しようとする課題】 従来のカルボキシペプチダーゼを用いる方法は、酵素の基質特異性や活性が C 末端アミノ酸あるいはそれに隣接するアミノ酸によってさまざまであること、さらに他のタンパク質分解酵素の混在があることから求めている以外のペプチド結合の切断が起き、正確な分析が困難になることがあった。また

この方法では酵素が自己消化性を持つことおよび酵素の精製が不十分の場合があること、といった理由によってアミノ酸およびペプチドが混入し汚染となるため微量分析には適していない。

【0 0 0 4】 また、他の化学的な方法等は十分には実用化されていない。そこで本発明は、酵素を用いることなく、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定する化学的方法を提供しようとするものである。

【0 0 0 5】

【課題を解決するための手段】 本発明においては、上記の欠点を克服し C 末端からのアミノ酸の配列分析を実行するために、タンパク質あるいはペプチドに酸無水物を作用させ、カルボキシ末端をオキサゾロンとする工程を含むタンパク質またはペプチドのカルボキシ末端アミノ酸を遊離させる工程と、得られたアミノ酸またはアミノ酸誘導体を分離し同定する操作と、を組み合わせた手順を繰り返し実行した。これにより、酵素を用いることなく、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することが可能になった。

【0 0 0 6】

【発明の実施の形態】 本発明の一つの実施手順として、下記第 1 工程と第 2 工程とから構成される操作と、生成したアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを繰り返した。

第 1 工程

タンパク質あるいはペプチドに、酸無水物を作用させ、タンパク質あるいはペプチドのアミノ末端を保護し、C 末端のアミノ酸残基にオキサゾロンを生成させる。

【0 0 0 7】 第 2 工程

生成したカルボキシ末端がオキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチドに酸とアルコールを作用させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる。当該実施手順における別の一例として、上記の欠点を克服し C 末端からのアミノ酸の配列分析を実行するために、上記第 1 工程において酢酸を添加し、第 1 工程から第 2 工程までの各工程から構成される一連の操作と、生成したアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施した。

【0 0 0 8】 本発明の別の実施手順として、下記第 1 工程から第 3 工程までの各工程から構成される一連の操作と、生成したアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを繰り返した。

第 1 工程

タンパク質あるいはペプチドに、酸無水物を作用させ、タンパク質あるいはペプチドのアミノ基を保護し、C 末端のアミノ酸残基にオキサゾロンを生成させる。

【0 0 0 9】 第 2 工程

アルコールを作用させ、第 1 工程の反応生成物に含まれるオキサゾロンに、アルコリス（エステル化）を生起

させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる。

### 第 3 工程

アミンを作用させ、第 2 工程の反応生成物に含まれるエステルを加水分解反応する。

【 0 0 1 0 】 当該実施手順における別の一例として、上記第 1 工程において酢酸を添加し、第 1 工程から第 3 工程までの各工程から構成される一連の操作と、生成したアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施した。当該実施手順におけるさらに別の一例として、アルコールを作用させる第 2 工程を酸存在下で実施し、第 1 工程から第 3 工程までの各工程から構成される一連の操作と、生成したアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施した。

【 0 0 1 1 】 本発明のさらに別の実施手順として、下記第 1 工程から第 5 工程から構成される一連の操作と、生成したアミノ酸、あるいはアミノ酸誘導体を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施した。

### 第 1 工程

タンパク質あるいはペプチドに、酸無水物を作用させ、タンパク質あるいはペプチドのアミノ末端を保護し、C 末端のアミノ酸残基にオキサゾロンあるいは分子内酸無水物（アスパラギン酸の場合）を生成させる。

### 【 0 0 1 2 】 第 2 工程

酸存在下でアルコールを作用させ、第 1 工程の反応生成物に含まれるオキサゾロンに、アルコリシス（エステル化）を生起させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させるか、あるいは、分子内酸無水物をアルコリシスにより開環させる。

### 第 3 工程

酸無水物を作用させ、第 2 工程の反応生成物に含まれる、C 末端がエステル化されていないタンパク質あるいはペプチドの C 末端のアミノ酸残基にオキサゾロンを生成させる。

### 【 0 0 1 3 】 第 4 工程

酸存在下でアルコールで作用させ、第 3 工程の反応生成物に含まれるオキサゾロンに、アルコリシス（エステル化）を生起させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる。

### 第 5 工程

アミンを作用させ、第 4 工程の反応生成物に含まれるエステルを加水分解反応する。

【 0 0 1 4 】 当該実施手順における別の一例として、上記第 1 工程における酸無水物に代えて、ハロゲン化蟻酸のエステルを用い、第 1 工程から第 5 工程から構成される一連の操作と、生成したアミノ酸、あるいはアミノ酸誘導体を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施した。

【 0 0 1 5 】 当該実施手順におけるさらに別の一例として、アルコールを作用させる第 2 工程および第 4 工程を酸存在下で実施し、第 1 工程から第 5 工程までの各工程

から構成される一連の操作と、生成したアミノ酸、あるいはアミノ酸誘導体を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施した。

【 0 0 1 6 】 以下実施例に基づいて本発明を詳細に説明する。

（実施例 1）図 1 は本発明を示す工程図の一例である。

### 第 1 工程

タンパク質あるいはペプチドに、一般式、 $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_m - \text{CO} - \text{O} - \text{CO} - (\text{CH}_2)_n - \text{CH}_3$ （ $m$ 、 $n$  は 0 以上の整数）で表される有機酸の無水物、を作用させる。ここで、アミノ基が修飾され C 末端アミノ酸がオキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチドが得られる。

### 【 0 0 1 7 】 第 2 工程

次に、このアミノ基が修飾され C 末端アミノ酸がオキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチドに酸とアルコールを作用させる。ここで、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を 1 残基失ったタンパク質あるいはペプチドと元の C 末端アミノ酸との混合物が得られる。

【 0 0 1 8 】 ここで得られたアミノ酸を分離し同定することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端のアミノ酸を決定することが出来る。以下、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を 1 残基失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程および第 2 工程の操作と、得られたアミノ酸を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【 0 0 1 9 】 （実施例 2）ここでは本発明の、タンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程および第 2 工程の操作と、第 2 工程を実施した後生成した混合物からアミノ酸を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによってタンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定する操作手順の一例を示す。

【 0 0 2 0 】 図 2 は本発明の実験手順を示す反応式の一例である。

### 第 1 工程

試料に、無水酢酸を作用させる。反応条件は下記の通りである。

反応条件

無水酢酸濃度 2 0 %（アセトニトリル溶液、酢酸を 1 % になるように加えたもの。）

反応温度 6 0 °C

反応時間 3 0 分間

この反応後減圧乾固し、用いた試薬と溶媒とを除去する。

### 【 0 0 2 1 】 第 2 工程

得られた試料に、ペンタフルオロプロピオン酸（PFPA）とメタノールを作用させる。反応条件は下記の通りである。

反応条件



PFP A 濃度 50% (メタノール溶液)

反応温度 60℃

反応時間 30分間

この条件下においては、PFP A とメタノールとが反応して、エステルであるペンタフルオロプロピオン酸メチルが生成する。さらに、減圧乾固し、用いた試薬と溶媒とを除去する。

【0022】第2工程を実施後、得られた試料からアミノ酸を分離し、そのアミノ酸を同定する。

【0023】以下、アミノ基が修飾されC末端のアミノ酸を1残基失ったタンパク質あるいはペプチドに、第1測定条件

カラム : C18 MICROBORE (資生堂)

溶離条件: 下記A, B 2液による濃度勾配溶出

A液 0.1% TFA 水溶液

B液 0.1% TFA を含む80%アセトニトリル水溶液

分析時間	溶離液組成	流速 (ml/min)
0-5min	A液100%	0.15
5-30min	A液100→0% (直線勾配)	0.15
30-35min	A液0%	0.15
35-36min	A液0→100% (直線勾配)	0.15→0.30
36-44min	A液100%	0.30
44-45min	A液100%	0.30→0.15

検出波長: 280nm

【0026】本条件を用いて分析した標準化合物は下記の通りである。分析結果をそれぞれ下記の番号の図に示した。図5にアラニルトリプトファン (Ala-Trp) を示す。図6にN-アセチルアラニルトリプトファン (Ac-Ala-Trp) を示す。図7にN-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニン (Ac-Ala-Trp-Met-Arg-Phe) を示す。図8にN-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニラニン (Ac-Ala-Trp-Met-Arg-Phe-Ala) を示す。

【0027】図7において、N-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニンのピークが2個観察されている。これらは互いに異性体である。

【0028】(実施例4) ここでは第1工程の操作における条件下での、オキサゾロンの生成を示す。試料として、アラニルトリプトファン (Ala-Trp) を用いた。オキサゾロンは水の作用によって容易に開裂する反応を利用した。検出には高速液体クロマトグラフ (HPLC) 分析を用いた。第1工程の手順に従って得られた試料に水を作用させて得た反応生成物をHPLCで分析した結果を第9図に示す。HPLC分析の条件は実施

工程および第2工程の手順と、第2工程を実施して得られたアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【0024】(実施例3) ここでは本発明を説明するために用いたHPLC分析の条件と、HPLCによる標準化合物の分析結果を示す。HPLC分析の条件は下記の通りである。

【0025】

【表1】

例3に示した通りである。

【0029】HPLC分析のための試料調製手順は下記の通りである。

①試料を減圧乾固する。

② 0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) に溶解する。図7との比較からわかるように、図9においてN-アセチルアラニルトリプトファン (Ac-Ala-Trp) 6、が検出されており、第1工程においてオキサゾロンが生成したことがわかる。ここで、試料として用いたアラニルトリプトファンは検出されなかった。

【0030】(実施例5) ここでは第2工程の操作における条件下での、オキサゾロン環の開裂を示す。試料として、N-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニラニン (Ac-Ala-Trp-Met-Arg-Phe-Ala) を用いた。検出には、実施例4と同条件のHPLC分析を用いた。HPLC分析のための試料調製手順は実施例4に記した通りである。

【0031】実施例2に示した第2工程の操作を行って得られた反応生成物を分析した結果を図10に示す。図7との比較からわかるように、図10において、試料として用いたN-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニラニン (Ac-

Ala-Trp-Met-Arg-Phe-Ala) の C 末端アミノ酸であったアラニンを失った生成物、N-アセチラルアニルトリプトファンメチオニルアルギニルフェニルアラニン (Ac-Ala-Trp-Met-Arg-Phe)、符号 7 および符号 8、が検出されている。これによって、第 2 工程の操作における条件下でオキサゾロン環の開裂が起き、C 末端アミノ酸が遊離し、C 末端アミノ酸を失ったペプチド (アミノ末端がアセチル化されたもの) が生成したことがわかる。この C 末端アミノ酸を同定することによって、ペプチドの C 末

【0032】以降、この C 末端アミノ酸を失ったペプチド (アミノ末端がアセチル化されたもの) に上記第 1 工程と第 2 工程とから構成される操作と、生成したアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施することによって、用いたタンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【0033】以上実施例 1 から実施例 5 において述べてきた結果をまとめると次のようになる。本発明においては、C 末端からのアミノ酸の配列分析を実行するために、下記第 1 工程と第 2 工程とから構成される操作と、生成したアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施した。

#### 【0034】第 1 工程

タンパク質あるいはペプチドに、酸無水物を作用させ、タンパク質あるいはペプチドのアミノ末端を保護し、C 末端のアミノ酸残基にオキサゾロンを生成させる。

#### 第 2 工程

生成したカルボキシ末端がオキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチドに酸とアルコールを作用させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる。

【0035】以下、本発明における別の実施手順を詳細に説明する。

(実施例 6) 図 11 は本発明を示す工程図の一例である。

#### 第 1 工程

タンパク質あるいはペプチドに、一般式、 $\text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_m - \text{CO} - \text{O} - \text{CO} - (\text{CH}_2)_n - \text{CH}_3$  ( $m, n$  は 0 以上の整数) で表される有機酸の無水物、を作用させる。ここで、アミノ基が修飾され C 末端アミノ酸がオキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチドが得られる。

#### 【0036】第 2 工程

次に、このアミノ基が修飾され C 末端アミノ酸がオキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチドに、アルコールを酸存在下で作用させる。ここで、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失い新たに出現した C 末端のアミノ酸のカルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドと元の C 末端アミノ酸との混合物が得

られる。

#### 【0037】第 3 工程

さらに、ここでアミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失い新たに出現した C 末端のアミノ酸のカルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドとアミノ酸との混合物に、例えば、一般式、 $\text{NR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ 、で表されるアミンの水溶液を作用させる。ここで、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドとアミノ酸との混合物が得られる。

【0038】上記第 1 工程から第 3 工程において得られたアミノ酸を分離し同定することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端のアミノ酸を決定することが出来る。以下、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 3 工程の一連の操作と、得られたアミノ酸を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【0039】(実施例 7) ここでは本発明の、タンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 3 工程の一連の操作と、第 2 工程を実施した後生成した混合物からアミノ酸を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによってタンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定する操作手順の一例を示す。

【0040】図 12 は本発明の実験手順を示す反応式の一例である。

#### 第 1 工程

試料に、無水酢酸を作用させる。反応条件の一例は下記の通りである。

#### 反応条件

無水酢酸濃度 20% (アセトニトリル溶液、酢酸を 1% になるように加えたもの。)

反応温度 60℃

反応時間 30 分間

この反応後減圧乾固し、用いた試薬と溶媒とを除去する。

#### 【0041】第 2 工程

こうして得られた試料に、ペンタフルオロプロピオン酸 ( $\text{CF}_3 - \text{CF}_2 - \text{COOH}$ ; 以降 PFPA と略称する。) 存在下でメタノールを作用させる。反応条件の一例は下記の通りである。

#### 反応条件

PFPA 濃度 10% (メタノール溶液)

反応温度 60℃

反応時間 30 分間

この反応後減圧乾固し、用いた試薬と溶媒とを除去する。

#### 【0042】第 3 工程

こうして得られた試料に、2-ジメチルアミノエタノール (以降 DMAE と略称する。) を作用させる。反応条

件は下記の通りである。

反応条件

DMAE濃度 1 0 % (水溶液)

反応温度 6 0 ℃

反応時間 3 0 分間

この一連の操作において、第 2 工程を実施後、得られた試料からアミノ酸を分離し、そのアミノ酸を同定する。

【 0 0 4 3 】以下、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 3 工程の一連の手順と、第 2 工程を実施して得られたアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【 0 0 4 4 】 (実施例 8) ここでは本発明の、タンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 3 工程の一連の操作と、第 3 工程を実施した後生成した混合物からアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施することによってタンパク質あるいはペプチドの C

測定条件

カラム : C 1 8 M I C R O B O R E (資生堂)

溶離条件 : 下記 A, B 2 液による濃度勾配溶出

A 液 0 . 1 % T F A 水溶液

B 液 0 . 1 % T F A を含む 8 0 % アセトニトリル水溶液

分析時間	溶離液組成	流速 (ml / min)
0 - 5 min	A 液 1 0 0 %	0 . 1 5
5 - 3 0 min	A 液 1 0 0 → 0 % (直線勾配)	0 . 1 5
3 0 - 3 5 min	A 液 0 %	0 . 1 5
3 5 - 3 6 min	A 液 0 → 1 0 0 % (直線勾配)	0 . 1 5 → 0 . 3 0
3 6 - 4 4 min	A 液 1 0 0 %	0 . 3 0
4 4 - 4 5 min	A 液 1 0 0 %	0 . 3 0 → 0 . 1 5

検出波長 : 2 8 0 n m

【 0 0 4 8 】本条件を用いて分析した標準化合物は下記の通りである。分析結果をそれぞれ下記の番号の図に示した。図 1 3 にトリプトファン (T r p) を示す。図 1 4 にアラニルトリプトファン (A l a - T r p) を示す。図 1 5 に N - アセチルアラニルトリプトファン (A c - A l a - T r p) を示す。図 1 6 に N - アセチルアラニルトリプトファンのエチルエステル (A c - A l a - T r p - O E t) を示す。

【 0 0 4 9 】 (実施例 1 0) ここでは第 1 工程の操作における条件下での、オキサゾロンの生成を示す。試料として、アラニルトリプトファン (A l a - T r p) 、を用いた。オキサゾロンは水の作用によって容易に開裂する反応を利用した。検出には高速液体クロマトグラフ (H P L C) 分析を用いた。第 1 工程の手順に従って得

末端からのアミノ酸配列を決定する操作手順の一例を示す。

【 0 0 4 5 】第 1 工程から第 3 工程までの一連の操作手順は実施例 7 に記述したものと同一である。この一連の操作において、第 3 工程を実施後、得られた試料からアミノ酸を分離し、そのアミノ酸を同定する。以下、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 3 工程の一連の手順と、第 3 工程を実施して得られたアミノ酸を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【 0 0 4 6 】 (実施例 9) ここでは本発明を説明するために用いた H P L C 分析の条件と、H P L C による標準化合物の分析結果を示す。H P L C 分析の条件は下記の通りである。

【 0 0 4 7 】

【表 2】

られた試料に水を作用させて得た反応生成物を H P L C で分析した結果を第 9 図に示す。H P L C 分析の条件は実施例 9 に示した通りである。

【 0 0 5 0 】 H P L C 分析のための試料調製手順は下記の通りである。

①試料を減圧乾固する。

② 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 (T F A) に溶解する。

図 1 5 との比較からわかるように、図 1 7 において N - アセチルアラニルトリプトファン (A c - A l a - T r p) 、符号 1 3 、が検出されており、第 1 工程においてオキサゾロンが生成したことがわかる。ここで、試料として用いたアラニルトリプトファンは検出されなかった。

【 0 0 5 1 】 (実施例 1 1) ここでは第 2 工程の操作に

おける条件下での、オキサゾロン環の開裂を示す。試料として、実施例 10 と同様に、アラニルトリプトファンを用いた。検出には、実施例 9 と同条件の HPLC 分析を用いた。HPLC 分析のための試料調製手順は実施例 5 に記した通りである。

【0052】実施例 7 に示した第 1 工程と第 2 工程の操作を行って得られた反応生成物を分析した結果を第 10 図に示す。図 13 との比較からわかるように、図 18 においてトリプトファン、符号 14、が検出されており、第 2 工程の操作における条件下でオキサゾロン環の開裂

が起きカルボキシ末端アミノ酸が遊離したことがわかる。

【0053】（実施例 12）実施例 11 において、オキサゾロンに PFPA のアルコール溶液を作用させカルボキシ末端アミノ酸を遊離させた。このアルコールの作用（アルコリシス）は、アミノ酸を遊離すると同時に新たに生じる C 末端アミノ酸のカルボキシル基をエステル化する。C 末端からのアミノ酸配列分析を引き続き実行す

#### 質量分析の条件

分析装置 : 二重収束質量分析計 HX-110 (日本電子)

測定条件 : 加速電圧 10 kV

分解能 1,000

イオン源 FAB (高速粒子衝撃法)

イオン化ガス Xe

イオンモード 陽イオン

FAB ガン加速電圧 6 kV

検出器 MULTIPLIER

付加電圧 -20 kV

データ処理システム DA5000

マトリックス

グリセロール : チオグリセロール : m-ニトロベンジル  
アルコール

(GLYCEROL : THIOGLYCEROL

: m-NITROBENZYLALCOHOL)

= 1 : 1 : 1

【0057】試料調製手順 :

①試料を減圧乾固する。

②67%酢酸水溶液（あるいはジメチルホルムアミド）に溶解する。

③ターゲット上にマトリックスを 1  $\mu$  l のせる。

④さらにターゲット上に試料溶液を 1  $\mu$  l のせ、混和する。

【0058】⑤イオン源に導入する。

【0059】（実施例 14）ここでは質量分析を用いて、第 1 工程におけるオキサゾロンを生成させる際の反応条件を検討した例を示す。試料として、配列番号 1 のペントペプチド、ロイシルトリプトファン-メチオニル-アルギニル-フェニルアラニン (Leu-Trp-Met-Arg-Phe) を用いた。本実施例においては、第 1 工程に引き続き第 2 工程を実施する手順と

るためには、このエステルを加水分解してカルボキシル基を得る必要がある。

【0054】ここでは第 3 工程の操作における条件下での、エステルの加水分解を示す。試料として、N-アセチルアラニルトリプトファンのエチルエステル (Ac-Ala-Trp-OEt) を用いた。検出には、実施例 9 と同条件の HPLC 分析を用いた。HPLC 分析のための試料調製手順は実施例 5 に記した通りである。

【0055】実施例 7 に示した第 3 工程の操作を行って得られた反応生成物を分析した結果を第 11 図に示す。図 15 との比較からわかるように、図 19 において N-アセチルアラニルトリプトファン (Ac-Ala-Trp)、符号 15、が検出されており、実施例 7 に示した第 3 工程の操作における条件下で、アミン水溶液の作用によってエステルが加水分解されたことがわかる。

【0056】（実施例 13）これ以降の実施例においては、質量分析を用いて本発明を説明する。本実施例においては質量分析の条件、および試料の調製手順を示す。

した。

【0060】第 1 工程における反応条件は実施例と同じく下記の通りである。

反応条件

無水酢酸濃度 : 20% (アセトニトリル溶液、酢酸を 1% になるように加えたもの。)

反応温度 : 60℃

反応時間 : 30 分間

第 2 工程の反応条件は下記の通りとした。用いる酸を、ヘプタフルオロ酪酸 (CF<sub>3</sub>-CF<sub>2</sub>-CF<sub>2</sub>-COOH : 以降 HFBA と略称する。) とし、用いるアルコールをエタノールとした。

【0061】反応条件

HFBA 濃度 : 5% (エタノール溶液)

反応温度 : 60℃

反応時間： 3 0 分間

得られた試料の質量分析を行った結果を第 2 0 図に示す。ここで、アミノ末端がアセチル化され C 末端アミノ酸を失い C 末端のカルボキシル基がエチルエステルとなった反応生成物（アセチル-ロイシル-トリプトファン-メチオニル-アルギニンのエチルエステル、分子量 6 7 5：以降 Ac-LWMR-OEt と略称する。）の分子イオンが検出されており（符号 1 6）、第 1 工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第 2 工程において C 末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

【0 0 6 2】（実施例 1 5）次に、第 1 工程における反応条件をさらに変化させた例を示す。試料として、実施例 1 4 と同様に配列番号 1 のペントペプチドを用いた。実施手順は実施例 1 4 と同様である。第 1 工程における反応条件を下記の通りとした。

反応条件

無水酢酸濃度 2 0 %（アセトニトリル溶液、酢酸を加えないもの。）

反応温度 6 0 °C

反応時間 3 0 分間

第 2 工程の反応条件は実施例 1 3 と同様である。

【0 0 6 3】得られた試料の質量分析を行った結果を第 2 1 図に示す。この条件下においても、Ac-LWMR-OEt の分子イオンが検出されており（符号 1 7）、第 1 工程においてオキサゾロンが生成したことがわかる。同時に分子量 7 1 8、および分子量 7 6 1 の分子イオン（それぞれ符号 1 8 および 1 9）が検出されており、アミノ末端がアセチル化され C 末端アミノ酸を失い C 末端のカルボキシル基がエチルエステルとなった反応生成物のアセチル化がさらに進行した化学種も生成したことがわかる。

【0 0 6 4】（実施例 1 6）次に、第 1 工程における反応条件をさらに変化させた例を示す。試料として、実施例 9 と同様に配列番号 1 のペントペプチドを用いた。実施手順は実施例 1 4 と同様である。第 1 工程における反応条件を下記の通りとした。

反応条件

無水酢酸濃度 2 0 %（アセトニトリル溶液、酢酸を 2 % となるように加えたもの。）

反応温度 6 0 °C

反応時間 3 0 分間

第 2 工程の反応条件は実施例 1 4 と同様である。

【0 0 6 5】得られた試料の質量分析を行った結果を第 2 2 図に示す。この条件下においても、Ac-LWMR-OEt の分子イオンが検出されており（符号 2 0）、第 1 工程においてオキサゾロンが生成したことがわかる。

【0 0 6 6】（実施例 1 7）次に、第 1 工程における反応条件をさらに変化させた例を示す。試料として、実施例 9 と同様に配列番号 1 のペントペプチドを用いた。実

施手順は実施例 1 4 と同様である。第 1 工程における反応条件を下記の通りとした。

【0 0 6 7】反応条件

無水酢酸濃度 5 %（アセトニトリル溶液、酢酸を 1 % になるように加えたもの）

反応温度 6 0 °C

反応時間 3 0 分間

第 2 工程の反応条件は実施例 1 4 と同様である。

【0 0 6 8】得られた試料の質量分析を行った結果を第 2 3 図に示す。この条件下においても、Ac-LWMR-OEt の分子イオンが検出されており（符号 2 1）、第 1 工程においてオキサゾロンが生成したことがわかる。

（実施例 1 8）さらに、第 2 工程における C 末端アミノ酸を遊離させる際の反応条件を検討した例を示す。試料として、配列番号 1 のペントペプチドを用いた。以降の実施例においても、第 1 工程に引き続き第 2 工程を実施する手順とした。第 1 工程における反応条件は実施例 1 4 と同じく下記の通りである。

【0 0 6 9】反応条件

無水酢酸濃度 2 0 %（アセトニトリル溶液、酢酸を 1 % になるように加えたもの。）

反応温度 6 0 °C

反応時間 3 0 分間

第 2 工程の反応条件を下記のように変化させた。

【0 0 7 0】反応条件

HFBA 濃度 2 %（エタノール溶液）

反応温度 6 0 °C

反応時間 3 0 分間

得られた試料の質量分析を行った結果を第 3 4 図に示す。ここで、Ac-LWMR-OEt の分子イオンが検出されており（符号 2 2）、第 1 工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第 2 工程において C 末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

【0 0 7 1】（実施例 1 9）さらに第 2 工程の反応条件を下記のように変化させた。

反応条件

HFBA 濃度 5 %（エタノール溶液）

反応温度 6 0 °C

40 反応時間 1 0 分間

第 1 工程における反応条件は実施例 9 と同じである。

【0 0 7 2】得られた試料の質量分析を行った結果を第 2 5 図に示す。ここで用いた条件下においても、Ac-LWMR-OEt の分子イオンが検出されており（符号 2 3）、第 1 工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第 2 工程において C 末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

（実施例 2 0）さらに第 2 工程の反応条件を下記のように変化させた。

【0 0 7 3】反応条件

HFB A濃度 5% (エタノール溶液)

反応温度 室温

反応時間 30分間

第1工程における反応条件は実施例14と同じである。

【0074】得られた試料の質量分析を行った結果を第26図に示す。ここで用いた条件下においても、Ac-LWMR-OEtの分子イオンが検出されており(符号24)、第1工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第2工程においてC末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

【0075】(実施例21)さらに第2工程の反応条件を下記のように変化させた。

反応条件

HFB A濃度 5% (エタノール溶液)

反応温度 5℃

反応時間 30分間

第1工程における反応条件は実施例14と同じである。

【0076】得られた試料の質量分析を行った結果を第27図に示す。ここで用いた条件下においても、Ac-LWMR-OEtの分子イオンが検出されており(符号25)、第1工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第2工程においてC末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

【0077】(実施例22)さらに第2工程の反応条件を下記のように変化させた。

反応条件

HFB A濃度 5% (エタノール溶液)

反応温度 100℃

反応時間 15分間

第1工程における反応条件は実施例14と同じである。

【0078】得られた試料の質量分析を行った結果を第28図に示す。ここで用いた条件下においても、Ac-LWMR-OEtの分子イオンが検出されており(符号26)、第1工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第2工程においてC末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

【0079】(実施例23)さらに第2工程の反応条件を下記のように変化させた。

反応条件

HFB A濃度 5% (メタノール溶液)

反応温度 60℃

反応時間 30分間

第1工程における反応条件は実施例14と同じである。

【0080】得られた試料の質量分析を行った結果を第29図に示す。ここで用いた条件下において、アミノ末端がアセチル化され、C末端アミノ酸を失い、C末端のカルボキシル基がエチルエステルとなった反応生成物

(アセチル-ロイシル-トリプトファン-メチオニル-アルギニンのメチルエステル、分子量 661:以降Ac-LWMR-OMeと略称する。)の分子イオン

が検出されており(符号27)、第1工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第2工程においてC末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

【0081】(実施例24)さらに第2工程の反応条件を下記のように変化させた。

反応条件

HFB A濃度 5% (メタノール溶液)

反応温度 5℃

反応時間 30分間

10 第1工程における反応条件は実施例14と同じである。

【0082】得られた試料の質量分析を行った結果を第30図に示す。ここで用いた条件下においても、Ac-LWMR-OMeの分子イオンが検出されており(符号28)、第1工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第2工程においてC末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

【0083】(実施例25)さらに第2工程の反応条件を下記のように変化させた。

反応条件

20 PFP A濃度 5% (エタノール溶液)

反応温度 60℃

反応時間 30分間

第1工程における反応条件は実施例14と同じである。

【0084】得られた試料の質量分析を行った結果を第31図に示す。ここで用いた条件下において、Ac-LWMR-OEtの分子イオンが検出されており(符号29)、第1工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第2工程においてC末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

30 【0085】(実施例26)さらに第2工程の反応条件を下記のように変化させた。

反応条件

PFP A濃度 20% (エタノール溶液)

反応温度 60℃

反応時間 30分間

第1工程における反応条件は実施例14と同じである。

【0086】得られた試料の質量分析を行った結果を第32図に示す。ここで用いた条件下においても、Ac-LWMR-OEtの分子イオンが検出されており(符号30)、第1工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第2工程においてC末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

【0087】(実施例27)次に、第1工程における反応条件を下記の通りとした。

反応条件

無水酢酸濃度 20% (アセトニトリル溶液、酢酸を1%になるように加えたもの。)

反応温度 60℃

反応時間 10分間

50 第2工程における反応条件を下記の通りとした。

## 【0088】反応条件

HFBA濃度 5% (メタノール溶液)

反応温度 室温

反応時間 30分間

得られた試料の質量分析を行った結果を第33図に示す。

【0089】この条件下においても、Ac-LWMR-OMeの分子イオンが検出されており(符号31)、第1工程においてオキサゾロンが生成したことがわかる。

【0090】(実施例28)次に、第1工程における反応条件を下記の通りとした。

## 反応条件

無水酢酸濃度 20% (アセトニトリル溶液、酢酸を1%になるように加えたもの。)

反応温度 90℃

反応時間 10分間

第2工程における反応条件を下記の通りとした。

## 【0091】反応条件

HFBA濃度 5% (メタノール溶液)

反応温度 室温

反応時間 30分間

得られた試料の質量分析を行った結果を第34図に示す。

【0092】ここで用いた条件下においても、Ac-LWMR-OMeの分子イオンが検出されており(符号32)、第1工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第2工程においてC末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

【0093】(実施例29)次に、第1工程における反応条件を下記の通りとした。

## 反応条件

無水酢酸濃度 20% (アセトニトリル溶液、酢酸を1%になるように加えたもの。)

反応温度 室温

反応時間 30分間

第2工程の反応条件を下記のように変化させた。

## 【0094】反応条件

HFBA濃度 5% (メタノール溶液)

反応温度 60℃

反応時間 30分間

得られた試料の質量分析を行った結果を第35図に示す。

【0095】ここで用いた条件下においても、Ac-LWMR-OMeの分子イオンが検出されており(符号33)、第1工程においてオキサゾロンが生成し、さらに第2工程においてC末端アミノ酸が遊離されたことがわかる。

【0096】以上実施例6から実施例29において述べてきた結果をまとめると次のようになる。本発明においては、C末端からのアミノ酸の配列分析を実行するため

に、下記第1工程から第3工程までの各工程から構成される一連の操作と、生成したアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施した。

## 【0097】第1工程

タンパク質あるいはペプチドに、酸無水物を作用させ、タンパク質あるいはペプチドのアミノ基を保護し、C末端のアミノ酸残基にオキサゾロンを生成させる。

## 第2工程

酸存在下でアルコールを作用させ、第1工程の反応生成物に含まれるオキサゾロンに、アルコールシス(エステル化)を生起させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる。

## 【0098】第3工程

アミンを作用させ、第2工程の反応生成物に含まれるエステルを加水分解する。

【0099】以下本発明における別の実施手順を詳細に説明する。

(実施例30)図36は本発明を示す工程図の一例である。

## 20 第1工程

タンパク質あるいはペプチドに、一般式、 $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_m - \text{CO} - \text{O} - \text{CO} - (\text{CH}_2)_n - \text{CH}_3$

(m、nは0以上の整数)で表される有機酸の無水物、を作用させる。ここで、アミノ基が修飾されC末端アミノ酸がオキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチドが得られる。この際、C末端のアミノ酸がアスパラギン酸である場合、アミノ基がアシル化されC末端のアスパラギン酸が分子内酸無水物となったタンパク質あるいはペプチドが得られる。

## 30 【0100】第2工程

次に、このアミノ基が修飾されC末端アミノ酸がオキサゾロンとなったタンパク質あるいはペプチド、あるいはアミノ基がアシル化されC末端のアスパラギン酸が分子内酸無水物となったタンパク質あるいはペプチドに、アルコールを酸存在下で作用させる。ここで、アミノ基がアシル化されC末端のアミノ酸を失い新たに出現したC末端のアミノ酸のカルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドと元のC末端アミノ酸との混合物が得られる。この際、アミノ基がアシル化されC末端のアスパラギン酸が分子内酸無水物となったタンパク質あるいはペプチドは、アミノ基がアシル化されC末端のアスパラギン酸のβ-カルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドとなる。

## 40 【0101】第3工程

さらに、このアミノ基がアシル化されC末端のアミノ酸を失い新たに出現したC末端のアミノ酸のカルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドと元のC末端アミノ酸との混合物、あるいはアミノ基がアシル化されC末端のアスパラギン酸のβ-カルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドに、一

般式、 $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_m - \text{CO} - \text{O} - \text{CO} - (\text{CH}_2)_n - \text{CH}_3$  ( $m, n$ は0以上の整数)で表される有機酸の無水物、を作用させる。ここで、アミノ基が修飾されC末端のアミノ酸を失い新たに出現したC末端のアミノ酸のカルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドはなんら作用を受けない。元のC末端アミノ酸はアシル化されたアミノ酸誘導体となる。一方、アミノ基がアシル化されC末端のアスパラギン酸の $\beta$ -カルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドは、アミノ基がアシル化されC末端のアスパラギン酸の $\alpha$ -カルボキシル基がオキサゾロンとなり $\beta$ -カルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドとなる。

#### 【0102】第4工程

さらに、このアミノ基がアシル化されC末端のアミノ酸を失い新たに出現したC末端のアミノ酸のカルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドとアミノ酸誘導体との混合物、あるいはアミノ基がアシル化されC末端のアスパラギン酸の $\alpha$ -カルボキシル基がオキサゾロンとなり $\beta$ -カルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドに、アルコールを酸存在下で作用させる。ここで、アミノ基が修飾されC末端のアミノ酸を失い新たに出現したC末端のアミノ酸のカルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドとアミノ酸誘導体はなんら作用を受けない。一方、アミノ基が修飾されC末端のアスパラギン酸の $\alpha$ -カルボキシル基がオキサゾロンとなり $\beta$ -カルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドは、アミノ基が修飾されC末端のアミノ酸を失い新たに出現したC末端のアミノ酸のカルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドと、 $\beta$ -カルボキシル基がエステルとなったアスパラギン酸との混合物となる。

#### 【0103】第5工程

さらに、ここでアミノ基が修飾されC末端のアミノ酸を失い新たに出現したC末端のアミノ酸のカルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドとアミノ酸誘導体との混合物、あるいはアミノ基が修飾されC末端のアミノ酸を失い新たに出現したC末端のアミノ酸のカルボキシル基がエステルとなったタンパク質あるいはペプチドと $\beta$ -カルボキシル基がエステルとなったアスパラギン酸との混合物に、例えば、一般式、 $\text{NR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ で表されるアミンを作用させる。ここで、アミノ基が修飾されC末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドとアミノ酸誘導体との混合物、あるいはアミノ基が修飾されC末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドとアスパラギン酸との混合物が得られる。このアスパラギン酸は、元のC末端アミノ酸である。

【0104】上記第1工程から第5工程において得られたアミノ酸あるいはアミノ酸誘導体を分離し同定するこ

とによって、タンパク質あるいはペプチドのC末端のアミノ酸を決定することが出来る。以下、アミノ基が修飾されC末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第1工程から第5工程の一連の操作と、得られたアミノ酸あるいはアミノ酸誘導体を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【0105】(実施例31) ここでは本発明の、タンパク質あるいはペプチドに、第1工程から第5工程の一連の操作と、第2工程を実施した後生成した混合物からアミノ酸を分離し同定する操作と、第5工程を実施した後生成した混合物からアミノ酸を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによってタンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定する操作手順の一例を示す。図37は本発明の実験手順を示す反応式の一例である。図38は本発明の実験方法を示す図である。

#### 【0106】第1工程

20 試料に、無水酢酸を作用させる。まずタンパク質あるいはペプチド試料を含む試料溶液を小型の試験管34に入れた後乾燥させる。ここで、試験管35に反応試薬の溶液36(ここでは無水酢酸のアセトニトリル溶液)を入れておく。この試験管に先ほどの試料37を入れた小型の試験管34を入れる。この試験管35内を真空ポンプで減圧下に封管し反応を進行させる。

【0107】反応条件は下記の通りである。

反応条件

無水酢酸濃度 20% (アセトニトリル溶液)

30 反応温度 60℃

反応時間 10分間

この反応後、この試験管35の上部を開管し、小型の試験管34を取り出す。さらに、減圧乾固し、用いた試薬と溶媒とを除去する。

#### 【0108】第2工程

こうして得られた試料に、ヘプタフルオロ酪酸(HFBA)存在下でメタノールを作用させる。実験の手順と実験系の構成は第1工程に準じたものである。反応条件は下記の通りである。

40 反応条件

HFBA濃度 5% (メタノール溶液)

反応温度 25℃

反応時間 30分間

この反応後、この試験管の上部を開管し、小型の試験管内を取り出す。さらに、減圧乾固し、用いた試薬と溶媒とを除去する。

#### 【0109】第3工程

こうして得られた試料に、無水酢酸を作用させる。実験の手順と実験系の構成は第1工程と同一である。

50 第4工程



こうして得られた試料に、ヘプタフルオロ酪酸 (HFB A) 存在下でメタノールを作用させる。実験の手順と実験系の構成は第 2 工程と同一である。

#### 【0110】第 5 工程

こうして得られた試料に、2-ジメチルアミノエタノール (DMAE) を作用させる。実験の手順と実験系の構成は第 1 工程に準じたものである。試験管に入れる溶液は、DMAE の水溶液である。

#### 【0111】反応条件は下記の通りである。

反応条件

DMAE 濃度 50% (水溶液)

反応温度 50℃

反応時間 30 分間

この一連の操作において、第 2 工程を実施後、得られた試料からアミノ酸を分離し、そのアミノ酸を同定する。さらに、第 5 工程実施後に、得られた試料からアミノ酸を分離し、そのアミノ酸を同定する。

【0112】以下、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の手順と、第 2 工程を実施して得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、第 5 工程を実施して得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【0113】(実施例 32) ここでは本発明の、タンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の操作と、第 2 工程を実施した後生成した混合物からアミノ酸を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによってタンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定する操作手順の一例を示す。

【0114】第 1 工程から第 5 工程までの一連の操作手順は実施例 2 に記述したものと同一である。この一連の操作において、第 2 工程を実施後、得られた試料からアミノ酸を分離し、そのアミノ酸を同定する。さらに、第 5 工程実施後に、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する。以下、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の手順と、第 2 工程を実施して得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【0115】(実施例 33) ここでは本発明の、タンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の操作と、第 3 工程を実施した後生成した混合物からアミノ酸誘導体を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによってタンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定する操作手順の一例を示す。

【0116】第 1 工程から第 5 工程までの一連の操作手順は実施例 2 に記述したものと同一である。この一連の操作において、第 3 工程を実施後、得られた試料からアミノ酸誘導体を分離し、そのアミノ酸誘導体を同定する。さらに、第 5 工程実施後に、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する。以下、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の手順と、第 3 工程を実施して得られたアミノ酸誘導体を分離し同定する操作と、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【0117】(実施例 34) ここでは本発明の、タンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の操作と、第 4 工程を実施した後生成した混合物からアミノ酸誘導体を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによってタンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定する操作手順の一例を示す。

【0118】第 1 工程から第 5 工程までの一連の操作手順は実施例 2 に記述したものと同一である。この一連の操作において、第 4 工程を実施後、得られた試料からアミノ酸誘導体を分離し、そのアミノ酸誘導体を同定する。さらに、第 5 工程実施後に、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する。以下、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の手順と、第 4 工程を実施して得られたアミノ酸誘導体を分離し同定する操作と、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【0119】(実施例 35) ここでは、本発明の、タンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の操作と、第 5 工程を実施した後生成した混合物からアミノ酸およびアミノ酸誘導体を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによってタンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定する操作手順の一例を示す。

【0120】第 1 工程から第 5 工程までの一連の操作手順は実施例 2 に記述したものと同一である。この一連の操作において、第 5 工程を実施後、得られた試料からアミノ酸およびアミノ酸誘導体を分離し、そのアミノ酸およびアミノ酸誘導体を同定する。以下、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の手順と、第 5 工程を実施して得られたアミノ酸およびアミノ酸誘導体を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【0121】（実施例36）ここでは第1工程における、オキサゾロンの生成を示す。試料として、配列番号1のペンタペプチド、ロイシルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニン（Leu-Trp-Met-Arg-Phe）、を用いた。

【0122】オキサゾロンはアルコールの作用によって

#### 質量分析の条件

分析装置	: 二重収束質量分析計	HX-110（日本電子）
測定条件	: 加速電圧	10 kV
	分解能	1,000
	イオン源	FAB（高速粒子衝撃法）
	イオン化ガス	Xe
	イオンモード	陽イオン
	FABガン加速電圧	6 kV
	検出器	MULTIPLIER
	付加電圧	-20 kV
	データ処理システム	DA5000
	マトリックス	グリセロール：チオグリセロール：m-ニトロベンジル アルコール (GLYCEROL：THIOGLYCEROL ：m-NITROBENZYLALCOHOL) = 1：1：1

【0124】試料調製手順：

- ①試料を減圧乾固する。
- ②6.7%酢酸水溶液（あるいはジメチルホルムアミド）に溶解する。
- ③ターゲット上にマトリックスを1  $\mu$  lのせる。
- ④さらにターゲット上に試料溶液を1  $\mu$  lのせ、混和する。
- ⑤イオン源に導入する。

【0125】ここで、アミノ末端がアセチル化され、C末端のカルボキシル基がメチルエステルとなった反応生成物（Ac-LWMRF-OMe：アセチルロイシルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニンのメチルエステル、分子量808）の分子イオンが検出されており（符号38）、実施例31に示した第1工程において得られた試料にオキサゾロンが含まれていることがわかる。

【0126】（実施例37）ここでは第2工程における、オキサゾロン環の開裂を示す。試料として、実施例35と同様に配列番号1のペンタペプチド、ロイシルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニン（Leu-Trp-Met-Arg-Phe）、を用いた。

【0127】実施例31に示した第1工程と第2工程の操作を行って得られた試料の質量分析を行った結果を第40図に示す。ここでは、第1工程において得られた試料に、第2工程としてヘプタフルオロ酪酸（HFBA）存在下でメタノールを作用させた。実験の手順と実験系

容易に開裂しエステルとなることを利用した。実施例31に示した第1工程において得られた試料にメタノールを作用させた。この試料の質量分析を行った結果を第39図に示す。質量分析の条件は下記の通りである。

【0123】

の構成は第1工程に準じたものである。

【0128】反応条件は下記の通りである。

反応条件	
HFBA濃度	5%（メタノール溶液）
反応温度	25℃
反応時間	30分間

30 質量分析の条件は実施例36において記述したものと同一である。

【0129】アミノ末端がアセチル化され、C末端残基であったフェニルアラニンが脱離し、新たに出現したC末端のカルボキシル基がメチルエステルとなった反応生成物（Ac-LWMRF-OMe：アセチルロイシルトリプトファニルメチオニルアルギニンのメチルエステル、分子量661）の分子イオンが検出されており（符号39）、実施例2に示した第2工程においてオキサゾロン環の開裂が起きたことがわかる。

40 【0130】（実施例38）ここでは、高速液体クロマトグラフ（HPLC）分析と質量分析とを組み合わせ、第2工程におけるオキサゾロン環の開裂を示す。実施例31に示した第1工程、第2工程の操作を行って得られた反応生成物を高速液体クロマトグラフ（HPLC）で分離した結果を第41図に示す。ここでは、第1工程において得られた試料に、第2工程としてヘプタフルオロ酪酸（HFBA）存在下でエタノールを作用させた。実験の手順と実験系の構成は第1工程に準じたものである。

50 【0131】反応条件は下記の通りである。

反応条件

HFB A濃度 5% (エタノール溶液)

反応温度 25℃

反応時間 30分間

また、HPLC分析の条件と、試料調製手順は下記の通りである。

【0132】HPLC分析の条件

測定条件 : カラム C18 MICROBORE  
(資生堂)

溶出条件 : 下記2液を用いた濃度勾配溶出

A液 0.1% TFA水溶液

B液 0.1% TFAを含む80%アセトニトリル水溶液

分析時間

溶離液組成

0-5min.

A液80%

5-25min.

A液80→40% (LINEAR)

25-30min.

A液40%

試料調製手順:

①試料を減圧乾固する。

【0133】②0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)に溶解する。

各ピークと各生成物の溶出との対応を次のように確かめた。第41図に示した1から3の各フラクション(符号40から42にそれぞれ対応する)を分取し、それぞれ質量分析を行った。質量分析の条件は実施例36において記述したものと同一である。

【0134】図42はフラクション1(符号40)を分析した結果である。ここで、アミノ末端がアセチル化され、C末端残基であったフェニルアラニンが脱離し、新たに出現したC末端のカルボキシル基がエチルエステルとなった反応生成物(Ac-LWMR-OEt:アセチル-ロイシルトリプトファニル-メチオニル-アルギニンのエチルエステル、分子量675)の分子イオンが検出された(符号46)。この結果からも実施例31に示した第2工程においてオキサゾロン環の開裂が起きたことがわかる。

【0135】図43はフラクション2(符号41)を質量分析した結果である。第44図はフラクション3(符号42)を質量分析した結果である。これら2つのフラクションをそれぞれ分析したところ、いずれにおいてもアミノ末端がアセチル化された配列番号1のペプタペチド(Ac-LWMRF-OH:アセチル-ロイシルトリプトファニル-メチオニル-アルギニル-フェニルアラニン、分子量794)の分子イオンが検出された(符号47、および符号48)。これは第1工程におけるオキサゾロン生成時のラセミ化の進行を示していると

考えられる。

【0136】以上の結果からも、第1工程においてオキサゾロン環が得られ、第2工程においてそのオキサゾロン環が開裂したことがわかる。

【0137】(実施例39)ここでは第5工程における、エステルの加水分解を示す。試料として、実施例36と同様に配列番号1のペプタペチド、ロイシルトリプトファニル-メチオニル-アルギニル-フェニルアラニン(Leu-Trp-Met-Arg-Phe)、を用いた。

【0138】実施例31に示した第1工程から第5工程までの一連の操作を行って得られた試料の質量分析を行った結果を第45図に示す。質量分析の条件は実施例36において記述したものと同一である。ここで、アミノ末端がアセチル化され、C末端残基であったフェニルアラニンが脱離し、メチルエステルとなっていた新たに出て現したC末端のカルボキシル基が遊離のカルボキシル基となった反応生成物(Ac-LWMR-OH:アセチル-ロイシルトリプトファニル-メチオニル-アルギニン、分子量647)の分子イオンが検出されており(符号49)、実施例2に示した第5工程においてエステルの加水分解が起こったことがわかる。

【0139】以上実施例30から実施例39において述べてきた結果をまとめると次のようになる。本発明においては、C末端からのアミノ酸の配列分析を実行するために、下記第1工程から第5工程から構成される一連の操作と、生成したアミノ酸あるいはアミノ酸誘導体を分離し同定する操作との組み合わせを、繰り返し実施した。

30 【0140】第1工程

タンパク質あるいはペプチドに、酸無水物を作用させ、タンパク質あるいはペプチドのアミノ末端を保護し、C末端のアミノ酸残基にオキサゾロンあるいは分子内酸無水物(アスパラギン酸の場合)を生成させる。

第2工程

酸存在下でアルコールを作用させ、第1工程の反応生成物に含まれるオキサゾロンに、アルコリス(エステル化)を生起させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させるか、あるいは、分子内酸無水物をアルコリスにより開環させる。

40 【0141】第3工程

酸無水物を作用させ、第2工程の反応生成物に含まれる、C末端が開鎖されていないタンパク質あるいはペプチドのC末端のアミノ酸残基にオキサゾロンを生成させる。

第4工程

酸存在下でアルコールで作用させ、第3工程の反応生成物に含まれるオキサゾロンに、アルコリス(エステル化)を生起させ、カルボキシ末端アミノ酸を遊離させる。

## 【0142】第5工程

アミンを作用させ、第4工程の反応生成物に含まれるエステルを加水分解する。

## 【0143】

【発明の効果】本発明によれば、C末端からのアミノ酸の配列分析を実行するために、上記各工程から構成される一連の操作と、生成したアミノ酸を分離し同定する操作との組み合わせを繰り返し実施することによって、酵素を用いることなくタンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を順次決定することを可能としたため、酵素を使用することによるアミノ酸およびペプチドの混入や汚染を防止でき、微量分析に適する配列分析を提供できる。また、本発明によれば、求めるペプチド結合の切断を行え、正確な配列分析を行えるという効果がある。

## 【0144】

## 【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 5

配列の形 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 : Leu-Trp-Met-Arg-Phe  
1 5

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のアミノ酸配列を決定する第1の工程図である。

【図2】本発明の実験手順を示す反応式である。

【図3】従来のカルボキシンペプチダーゼを用いた場合の分析方法を示す工程図である。

【図4】従来のトリメチルシリルイソチオシアナートを用いた場合の分析方法を示す工程図である。

【図5】アラニルトリプトファンの溶出位置の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図6】N-アセチルアラニルトリプトファンの溶出位置の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図7】N-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニンの溶出位置の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図8】N-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニルアラニンの溶出位置の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図9】オキサゾロン生成の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図10】オキサゾロン環の開裂の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図11】本発明のアミノ酸配列を決定する第2の工程図である。

【図12】本発明の他の実験手順を示す反応式である。

【図13】トリプトファンの溶出位置の確認のためのH

PLCの結果を示す図である。

【図14】アラニルトリプトファンの溶出位置の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図15】N-アセチルアラニルトリプトファンの溶出位置の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図16】N-アセチルアラニルトリプトファンのエチルエステルの溶出位置の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図17】オキサゾロン生成の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図18】オキサゾロン環の開裂の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図19】加水分解の確認のためのHPLCの結果を示す図である。

【図20】実施例8で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図21】実施例9で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図22】実施例10で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図23】実施例11で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図24】実施例12で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図25】実施例13で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図26】実施例14で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図27】実施例15で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図28】実施例16で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図29】実施例17で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図30】実施例18で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図31】実施例19で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図32】実施例20で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図33】実施例21で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図34】実施例22で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図35】実施例23で得られた試料を質量分析した結果を示す図である。

【図36】本発明のアミノ酸配列を決定する第3の工程図である。

【図37】本発明の他の実験手順を示す反応式である。

【図38】本発明の他の実験方法を示す図である。

【図 3 9】オキサゾロン生成の確認のための質量分析の結果である。

【図 4 0】オキサゾロン環の開裂の確認のための質量分析の結果である。

【図 4 1】オキサゾロン環の開裂の確認のための H P L C の結果である。

【図 4 2】オキサゾロン環の開裂の確認のための、H P L C で分離した生成物の質量分析の結果である。

【図 4 3】オキサゾロン環の開裂の確認のための、H P L C で分離した生成物の質量分析の結果である。

【図 4 4】オキサゾロン環の開裂の確認のための、H P L C で分離した生成物の質量分析の結果である。

【図 4 5】加水分解の確認のための質量分析の結果である。

# 【符号の説明】

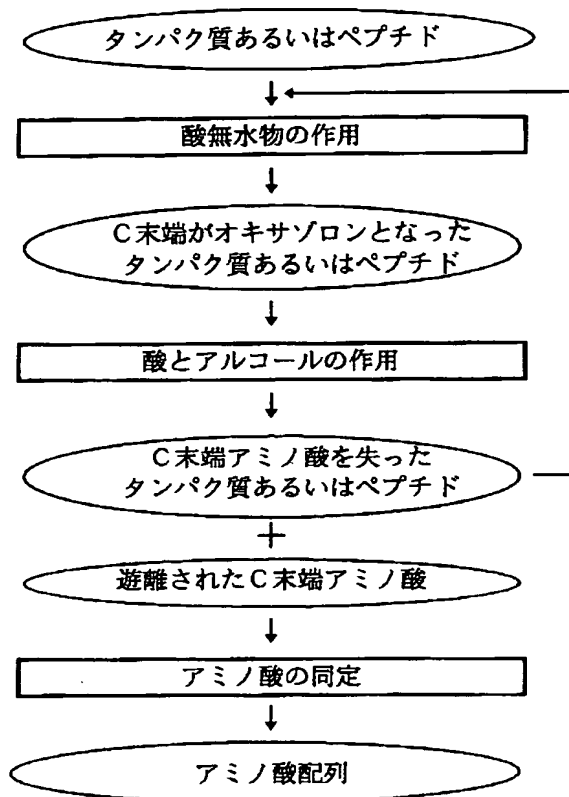
- 1 アラニルトリプトファンのピーク
- 2 N-アセチルアラニルトリプトファンのピーク
- 3 N-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニンのピーク
- 4 N-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニンのピーク
- 5 N-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニルアラニンのピーク
- 6 N-アセチルアラニルトリプトファンのピーク
- 7 N-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニンのピーク
- 8 N-アセチルアラニルトリプトファニルメチオニルアルギニルフェニルアラニンのピーク
- 9 トリプトファンのピーク
- 10 アラニルトリプトファンのピーク
- 11 N-アセチルアラニルトリプトファンのピーク
- 12 N-アセチルアラニルトリプトファンのエチルエステルのピーク
- 13 N-アセチルアラニルトリプトファンのピーク
- 14 トリプトファンのピーク
- 15 N-アセチルアラニルトリプトファンのピーク
- 16 A c - L W M R - O E t の分子イオンの信号
- 17 A c - L W M R - O E t アセチル化された化合物の分子イオンの信号
- 18 A c - L W M R - O E t のアセチル化がさらに進んだ化合物の分子イオンの信号
- 19 A c - L W M R - O E t の分子イオンの信号
- 20 A c - L W M R - O E t の分子イオンの信号
- 21 A c - L W M R - O E t の分子イオンの信号
- 22 A c - L W M R - O E t の分子イオンの信号
- 23 A c - L W M R - O E t の分子イオンの信号
- 24 A c - L W M R - O E t の分子イオンの信号
- 25 A c - L W M R - O E t の分子イオンの信号
- 26 A c - L W M R - O E t の分子イオンの信号
- 27 A c - L W M R - O M e の分子イオンの信号

- 28 A c - L W M R - O M e の分子イオンの信号
- 29 A c - L W M R - O E t の分子イオンの信号
- 30 A c - L W M R - O E t の分子イオンの信号
- 31 A c - L W M R - O M e の分子イオンの信号
- 32 A c - L W M R - O M e の分子イオンの信号
- 33 A c - L W M R - O M e の分子イオンの信号
- 34 小型の試験管
- 35 試験管
- 36 反応試薬の溶液
- 37 試料
- 38 配列番号 1 のペントペプチドのアミノ末端がアセチル化され C 末端のカルボキシル基がメチルエステルとなった反応生成物（分子量 8 0 8）に対応する分子イオン由来の信号
- 39 配列番号 1 のペントペプチドのアミノ末端がアセチル化され C 末端残基であったフェニルアラニンが脱離し新たに出現した C 末端のカルボキシル基がメチルエステルとなった反応生成物分子量 6 6 1）に対応する分子イオン由来の信号
- 40 実施例 2 に示した第 1 工程、第 2 工程の操作を行って得られた反応生成物を高速液体クロマトグラフ（H P L C）で分離したフラクション 1
- 41 実施例 2 に示した第 1 工程、第 2 工程の操作を行って得られた反応生成物を高速液体クロマトグラフ（H P L C）で分離したフラクション 2
- 42 実施例 2 に示した第 1 工程、第 2 工程の操作を行って得られた反応生成物を高速液体クロマトグラフ（H P L C）で分離したフラクション 3
- 43 配列番号 1 のペントペプチドのアミノ末端がアセチル化され C 末端残基であったフェニルアラニンが脱離し新たに出現した C 末端のカルボキシル基がエチルエステルとなった反応生成物（分子量 6 7 5）のピーク
- 44 配列番号 1 のペントペプチドのアミノ末端がアセチル化された反応生成物（分子量 7 9 4）のピーク
- 45 配列番号 1 のペントペプチドのアミノ末端がアセチル化された反応生成物（分子量 7 9 4）のピーク
- 46 配列番号 1 のペントペプチドのアミノ末端がアセチル化され C 末端残基であったフェニルアラニンが脱離し新たに出現した C 末端のカルボキシル基がエチルエステルとなった反応生成物（分子量 6 7 5）に対応する分子イオン由来の信号
- 47 配列番号 1 のペントペプチドのアミノ末端がアセチル化された反応生成物（分子量 7 9 4）に対応する分子イオン由来の信号
- 48 配列番号 1 のペントペプチドのアミノ末端がアセチル化された反応生成物（分子量 7 9 4）に対応する分子イオン由来の信号
- 49 配列番号 1 のペントペプチドのアミノ末端がアセチル化され C 末端残基であったフェニルアラニンが脱離しメチルエステルとなっていた新たに出現した C 末端の

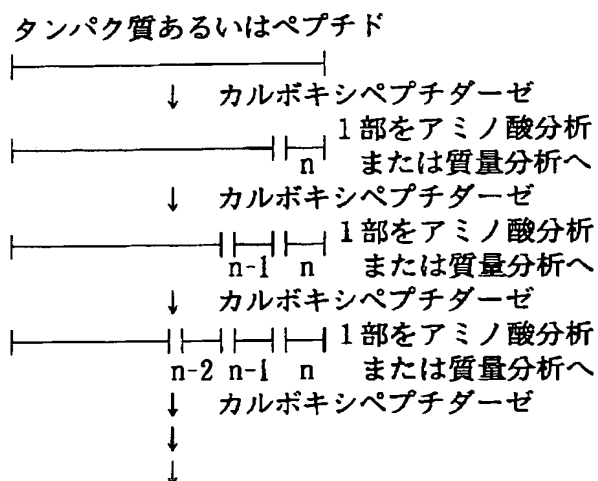
カルボキシル基が遊離のカルボキシル基となった反応生

成物（分子量647）に対応する分子イオン由来の信号

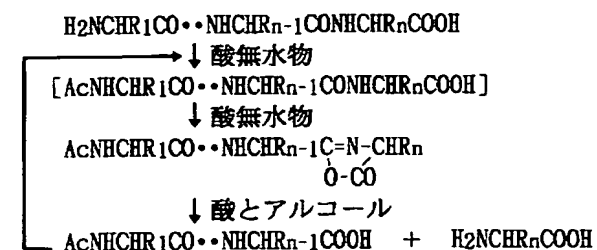
【図 1】



【图 3】

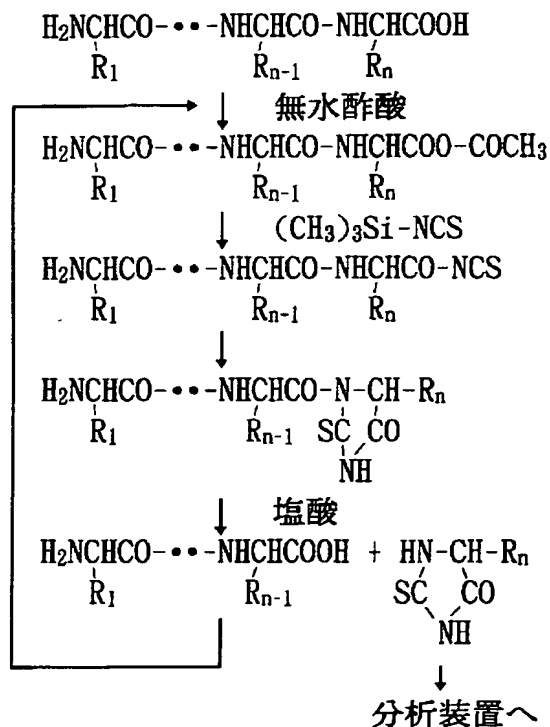


【図 2】

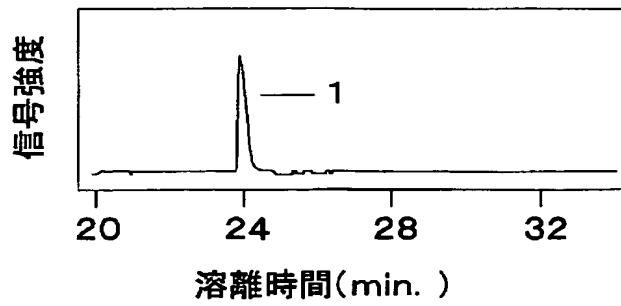


Ac : アセチル基  
R<sub>n</sub> : アミノ酸の側鎖

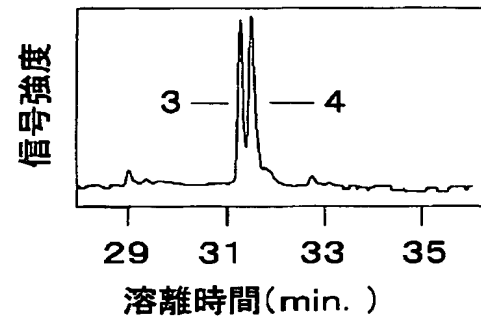
【图4】



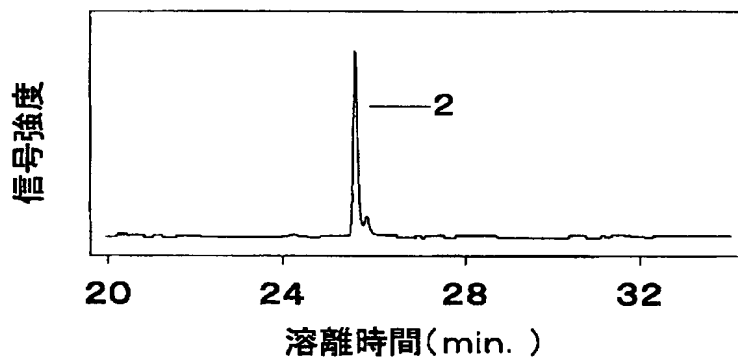
【図 5】



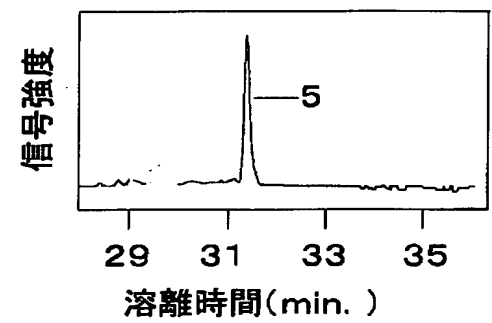
【図 7】



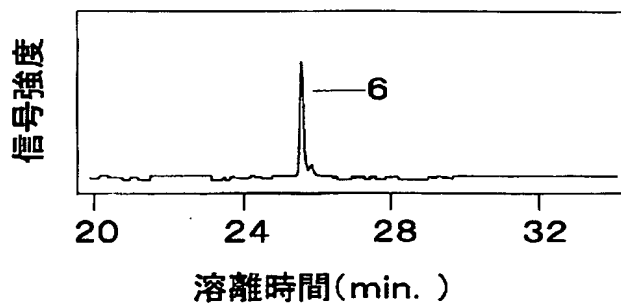
【図 6】



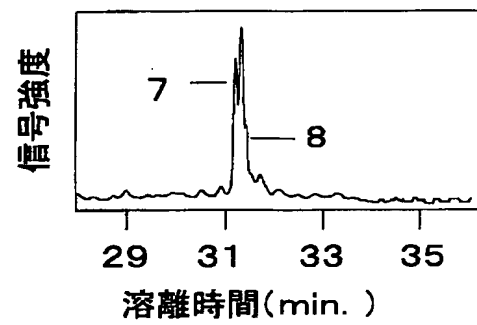
【図 8】



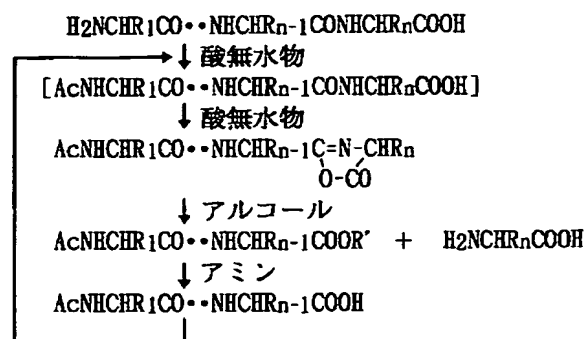
【図 9】



【図 10】

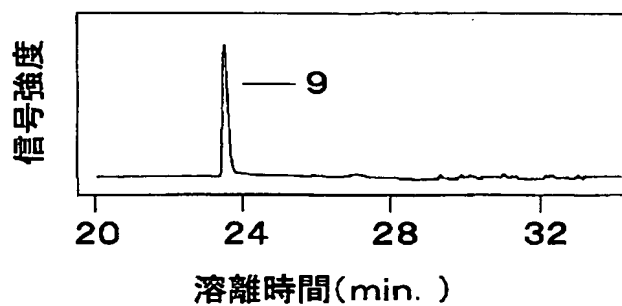


【図 1 2】



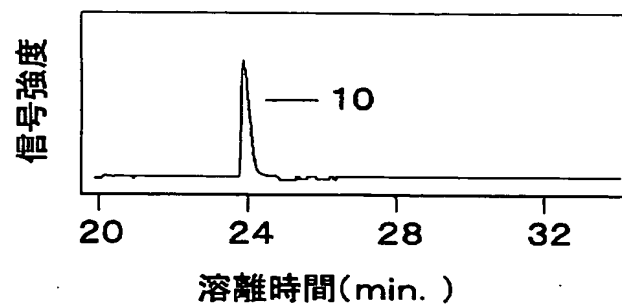
Ac : アセチル基  
R<sub>n</sub> : アミノ酸の側鎖  
R' : アルキル基

【圖 13】

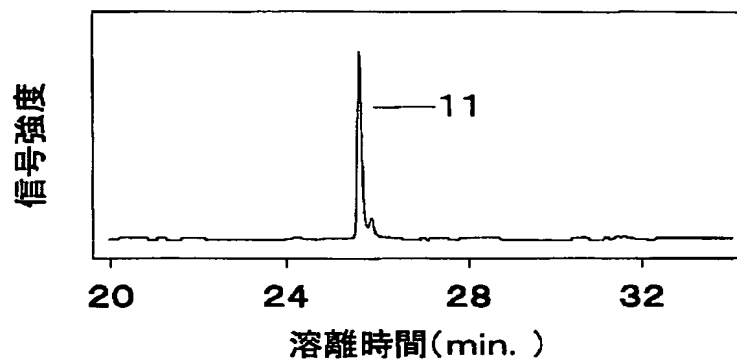




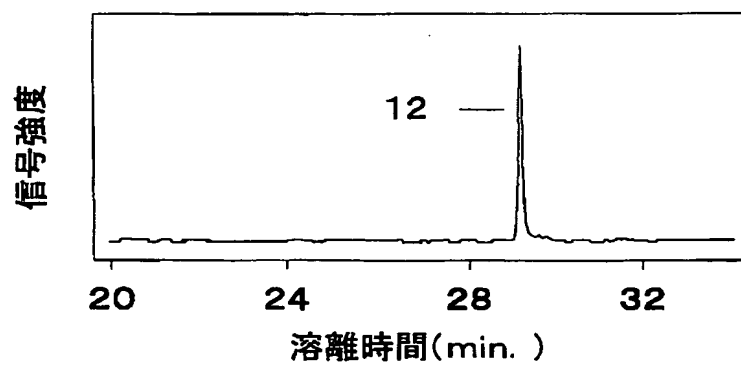
【図 1 4】



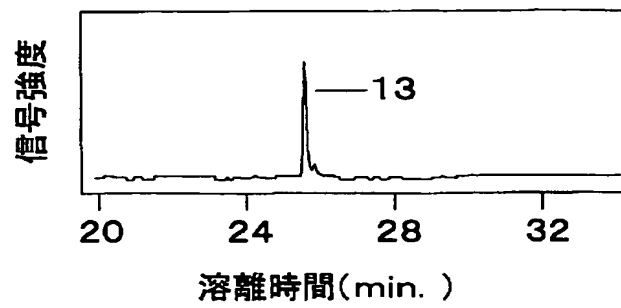
【図 1 5】



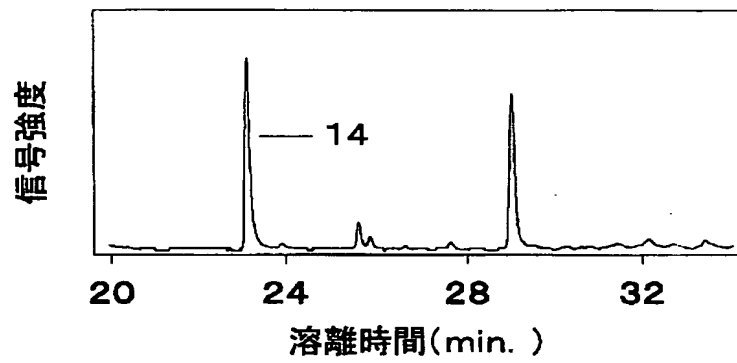
【図 1 6】



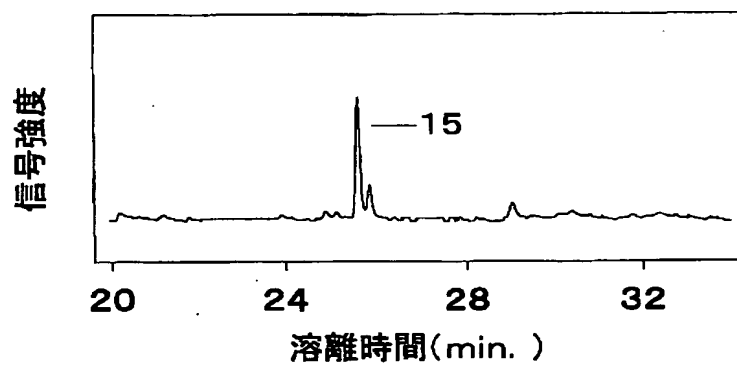
【図 1 7】



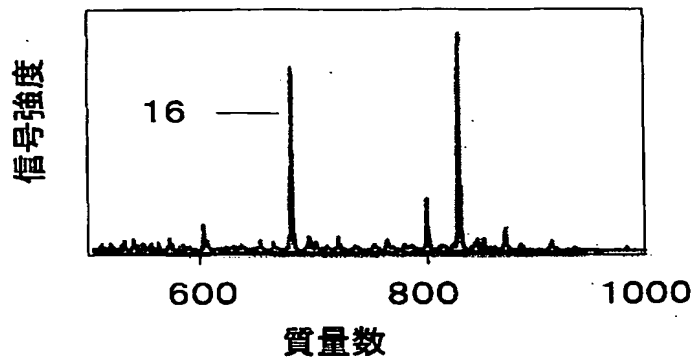
【図 1 8】



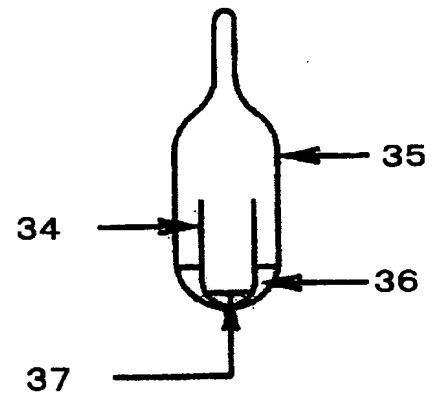
【図 1 9】



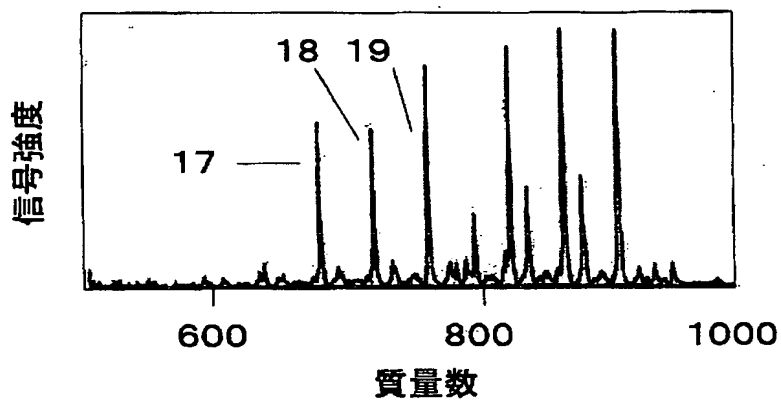
【図20】



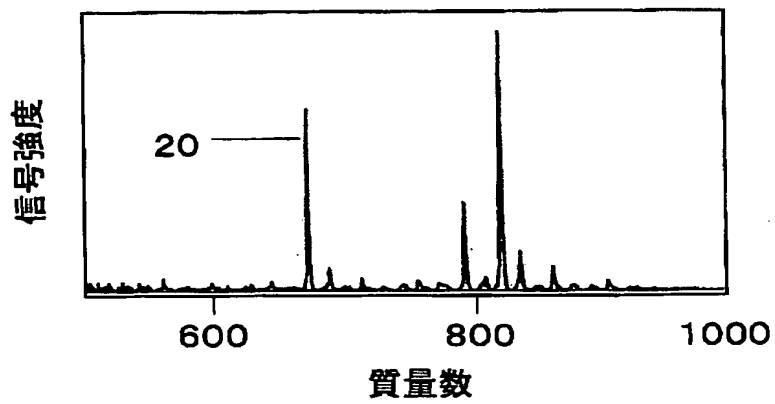
【図38】



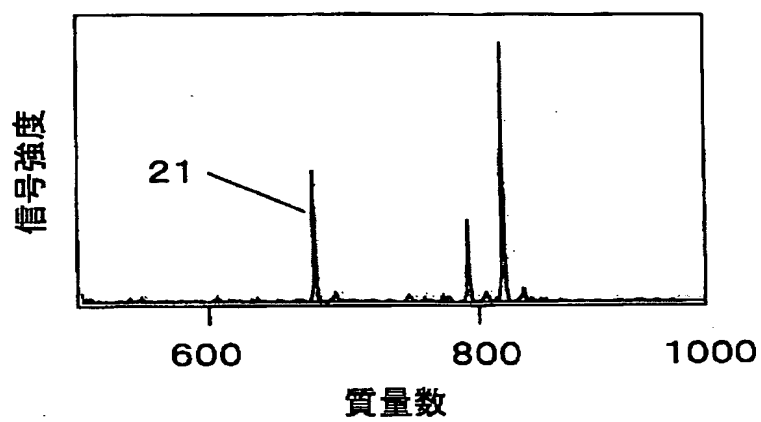
【図21】



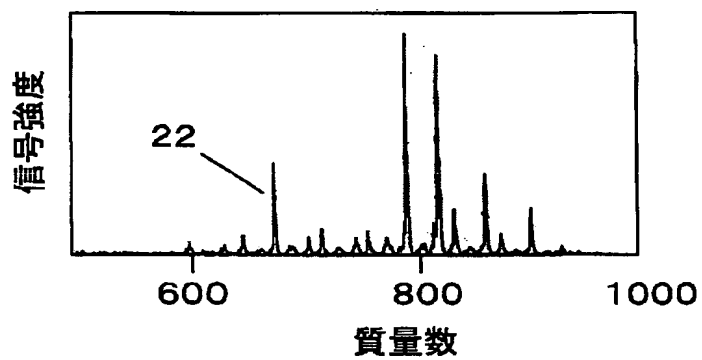
【図22】



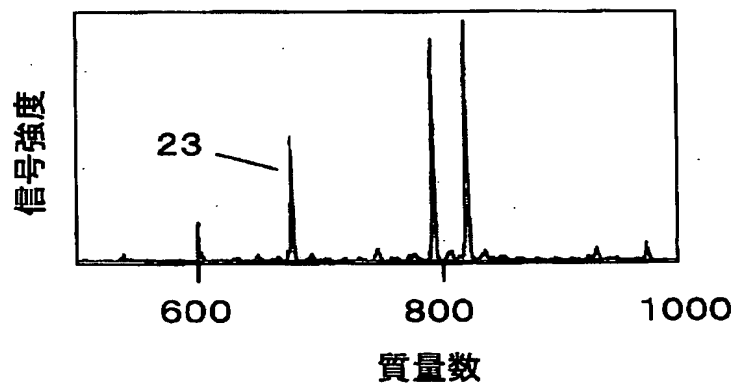
【図23】



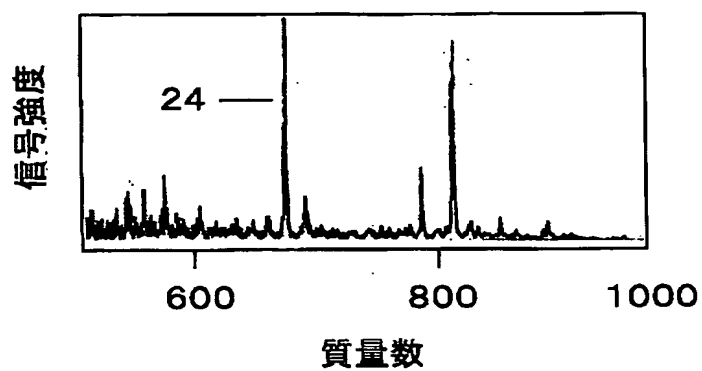
【図24】



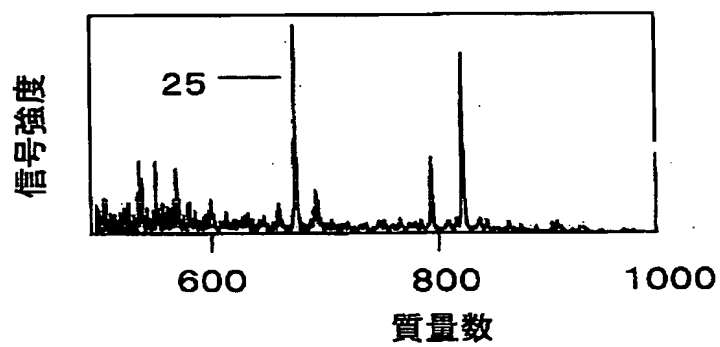
【図25】



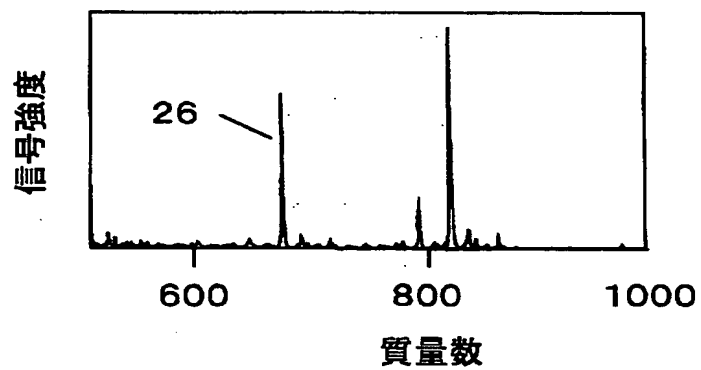
【図 26】



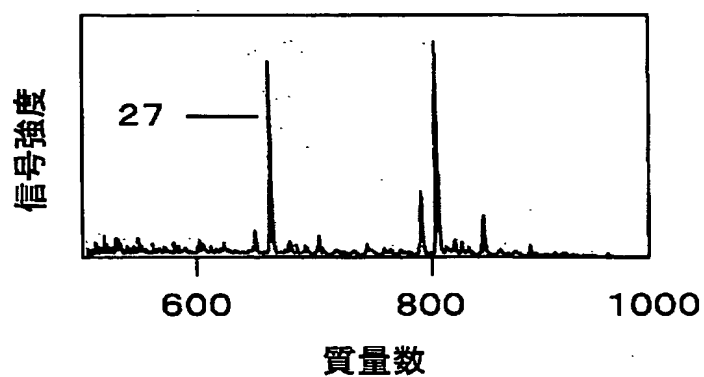
【図 27】



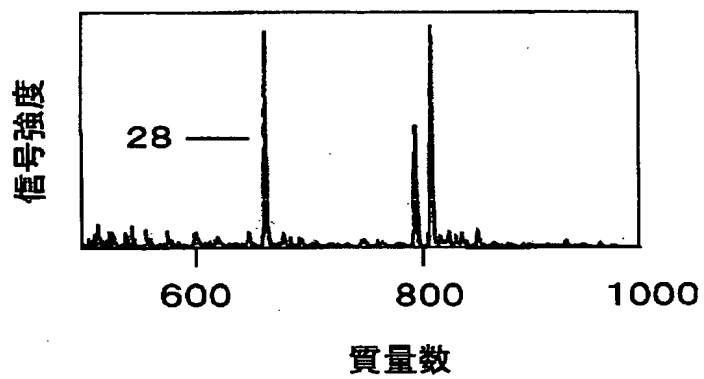
【図 28】



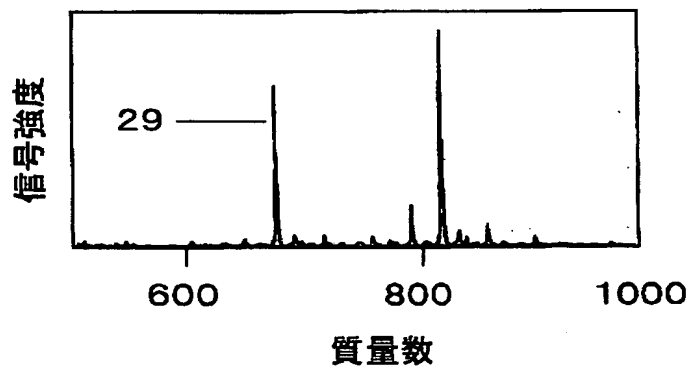
【図 29】



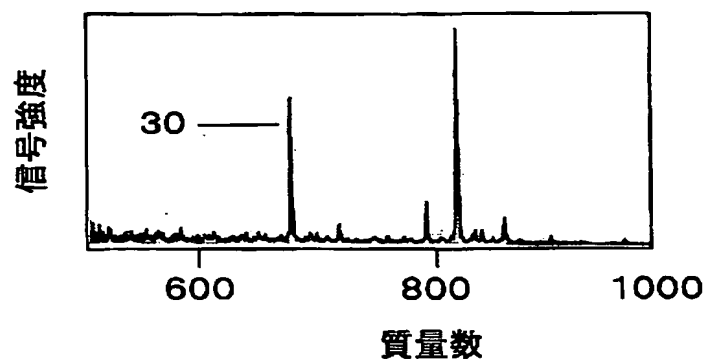
【図 30】



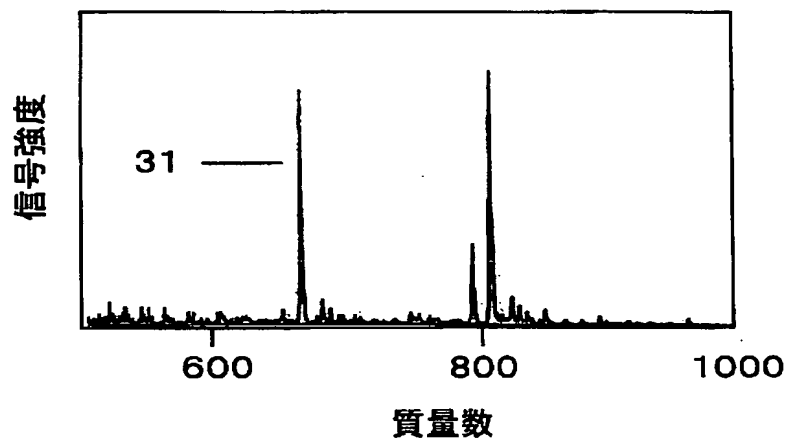
【図 31】



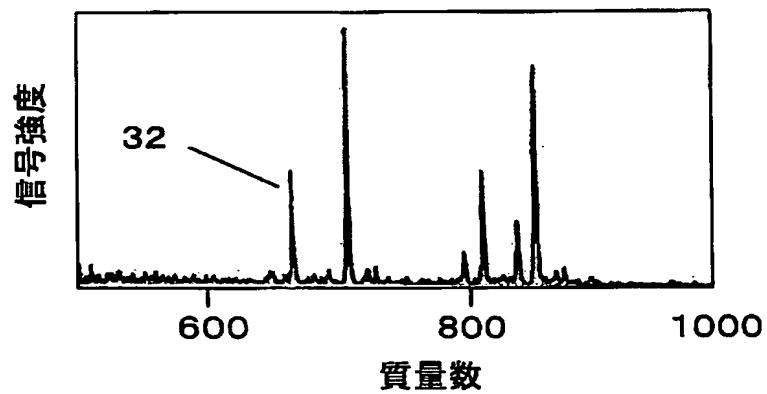
【図 3 2】



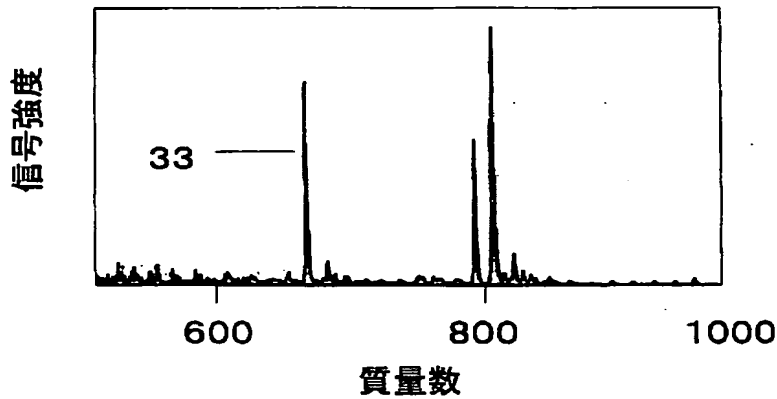
【図 3 3】



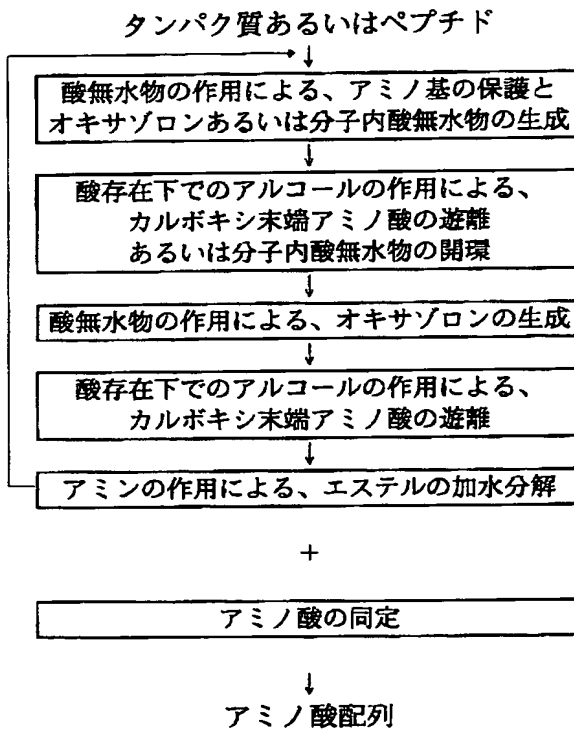
【図 3 4】



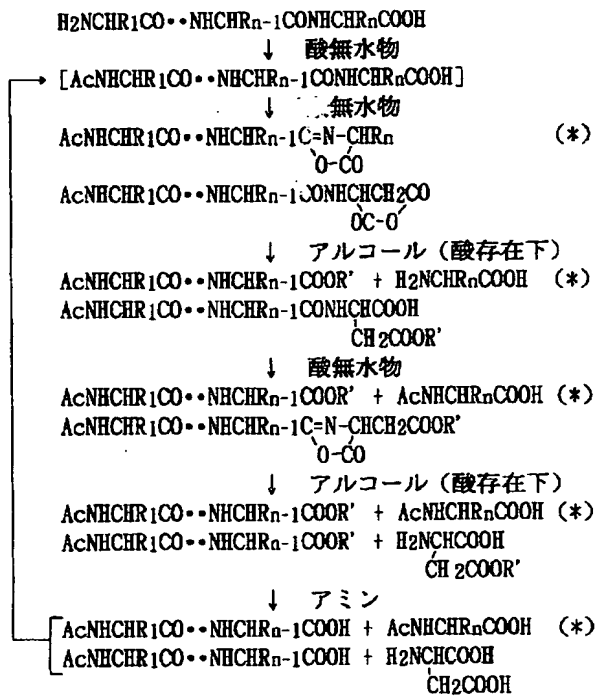
【図 35】



【図 36】



【図 37】



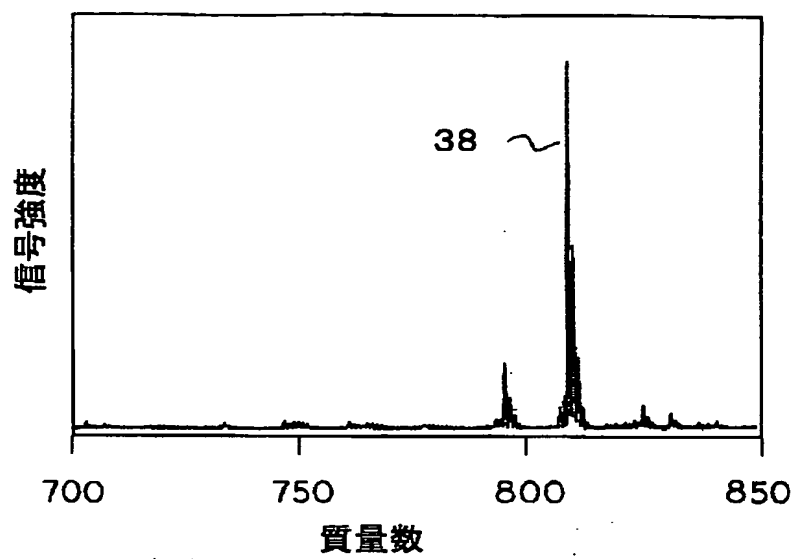
Ac : アセチル基

R<sub>n</sub> : アミノ酸の側鎖, R' : アルキル基

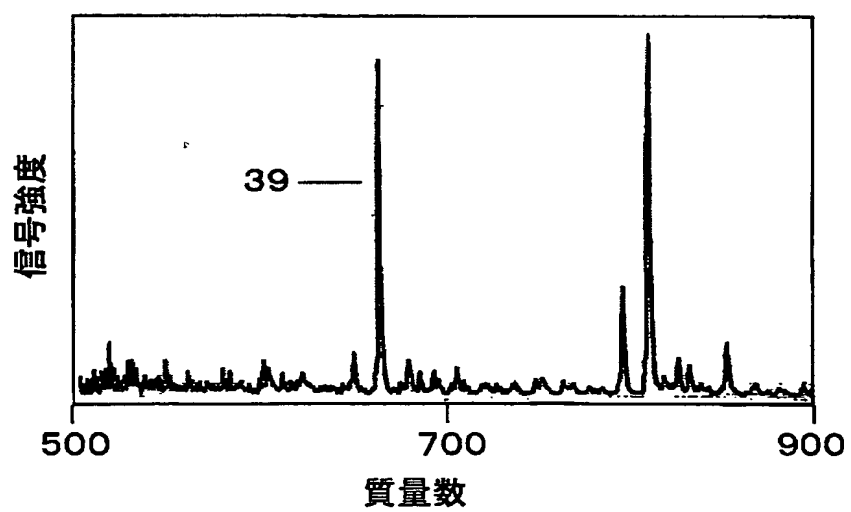
\* : C末端アミノ酸がアスパラギン酸以外の場合



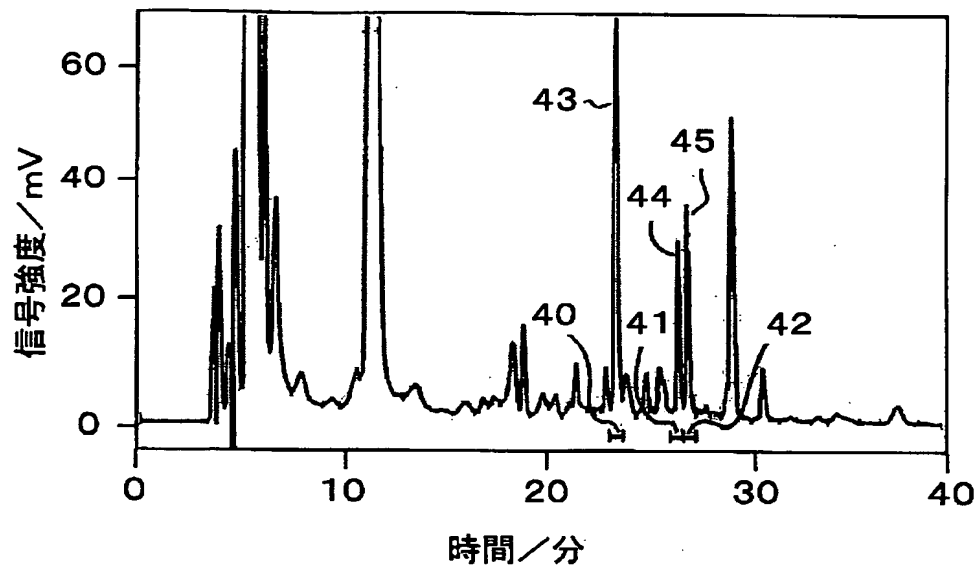
【図 3 9】



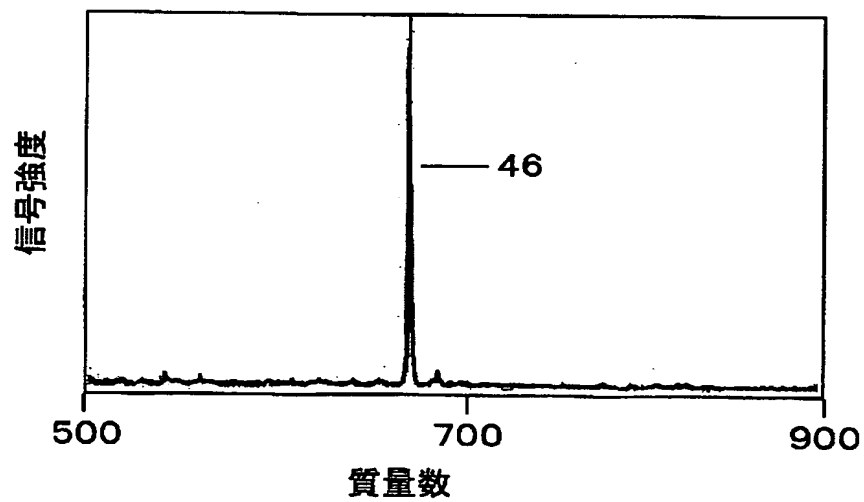
【図 4 0】



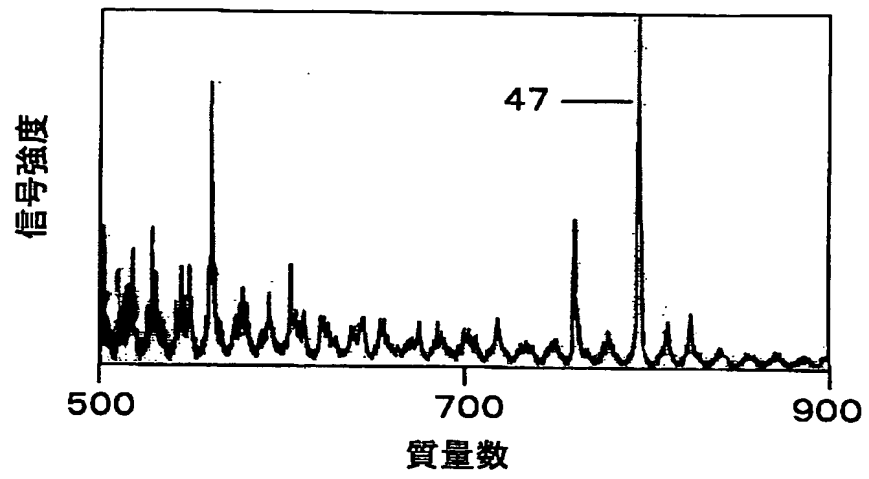
【図 4 1】



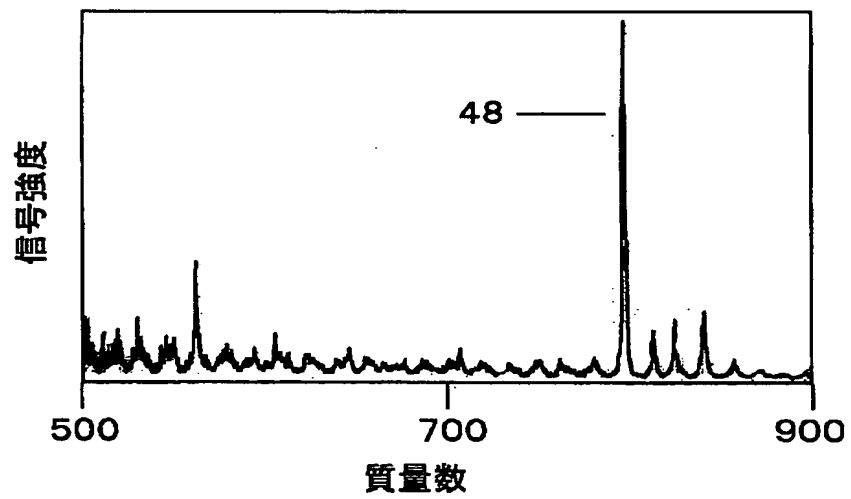
【図 4 2】



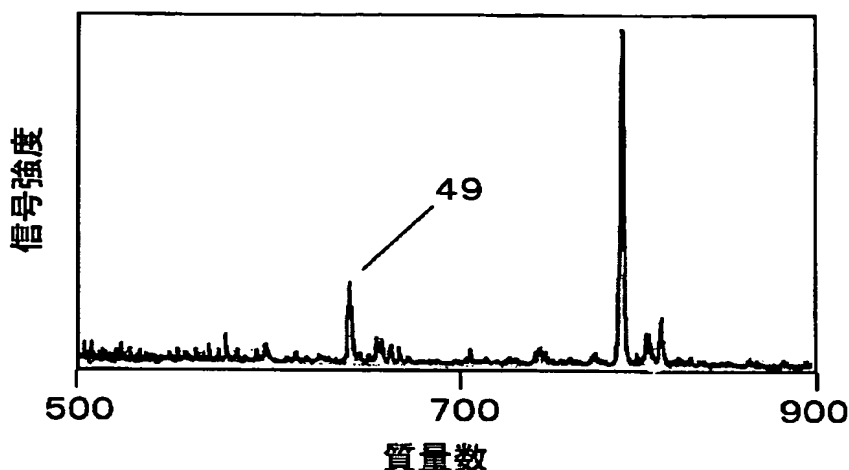
【図 4 3】



【図 4 4】



【図 45】



## 【手続補正書】

【提出日】平成 9 年 9 月 2 日

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0114

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0114】第 1 工程から第 5 工程までの一連の操作手順は実施例 31 に記述したものと同一である。この一連の操作において、第 2 工程を実施後、得られた試料からアミノ酸を分離し、そのアミノ酸を同定する。さらに、第 5 工程実施後に、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する。以下、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の手順と、第 2 工程を実施して得られたアミノ酸を分離し同定する操作と、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0116

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0116】第 1 工程から第 5 工程までの一連の操作手順は実施例 31 に記述したものと同一である。この一連の操作において、第 3 工程を実施後、得られた試料からアミノ酸誘導体を分離し、そのアミノ酸誘導体を同定する。さらに、第 5 工程実施後に、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する。以下、アミノ基が修飾さ

れ C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の手順と、第 3 工程を実施して得られたアミノ酸誘導体を分離し同定する操作と、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0118

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0118】第 1 工程から第 5 工程までの一連の操作手順は実施例 31 に記述したものと同一である。この一連の操作において、第 4 工程を実施後、得られた試料からアミノ酸誘導体を分離し、そのアミノ酸誘導体を同定する。さらに、第 5 工程実施後に、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する。以下、アミノ基が修飾され C 末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第 1 工程から第 5 工程の一連の手順と、第 4 工程を実施して得られたアミノ酸誘導体を分離し同定する操作と、残存するアミノ酸およびアミノ酸誘導体を除去する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

## 【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0120

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0120】第1工程から第5工程までの一連の操作手順は実施例31に記述したものと同一である。この一連の操作において、第5工程を実施後、得られた試料からアミノ酸およびアミノ酸誘導体を分離し、そのアミノ酸およびアミノ酸誘導体を同定する。以下、アミノ基が修飾されC末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドに、第1工程から第5工程の一連の手順と、第5工程を実施して得られたアミノ酸およびアミノ酸誘導体を分離し同定する操作とを、繰り返し実施することによって、タンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0132

【補正方法】変更

【補正内容】

## 【0132】HPLC分析の条件

測定条件

カラム : C18 MICROBORE (資生堂)

溶出条件 : 下記2液を用いた濃度勾配溶出

A液 0.1% TFA水溶液

B液 0.1% TFAを含む80%アセトニトリル水溶液

分析時間

溶離液組成

0 - 5 min.

A液80%

5 - 25 min.

A液80→40% (LINEAR)

25 - 30 min.

A液40%

試料調製手順:

①試料を減圧乾固する。

フロントページの続き

(72)発明者 次田 皓

千葉県柏市泉町17-28 石塚ビル305

(72)発明者 高本 圭司

千葉県流山市江戸川台東3-12-8 ベル  
グリーン203号